



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 305 234**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/04 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02723236 .2**

(86) Fecha de presentación : **27.02.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1385531**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **04.02.2004**

(54)

Título: **Diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer basado en la fosforilación de una proteína quinosa activada por mitógeno.**

(30)

Prioridad: **27.02.2001 US 271416 P**
17.10.2001 US 329505 P

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

(73)

Titular/es:
Blanchette Rockefeller Neurosciences Institute
9601 Medical Center Drive
Rockville, Maryland 20850, US

(72)

Inventor/es: **Zhao, Wei-Qin y**
Alkon, Daniel, L.

(74)

Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

ES 2 305 234 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer basado en la fosforilación de una proteína quinasa activada por mitógeno.

Antecedentes de la invención

La presente invención da a conocer una prueba de diagnóstico y cribado para la enfermedad de Alzheimer ("AD"). Un ejemplo de la prueba implica la detección de la fosforilación aumentada anormalmente de la quinasa extracelular de tipo 1 ó 2 regulada por señal ("Erk1/2") en fibroblastos de la piel de pacientes con AD tras la estimulación de las células con un agonista, tal como bradiquinina u otros agentes que estimulan el receptor del inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), en comparación con células de controles de la misma edad. La fosforilación aumentada se puede medir mediante transferencia Western utilizando anticuerpos específicos de la proteína fosforilada u otras tentativas similares.

La acumulación de pruebas indica que la patogénesis temprana de la enfermedad de Alzheimer (AD) implica la alteración de la homeostasis del calcio intracelular y niveles aumentados de estrés oxidativo que contribuyen a la toxicidad excitatoria y a la muerte neuronal en el cerebro con AD (Putney, 2000; Yoo y otros, 2000; Sheehan y otros, 1997). Los estudios han informado del aumento potenciado de los niveles Ca^{2+} intracelulares en cerebros con AD así como en células periféricas como respuesta a la activación de los receptores de bradiquinina y la inactivación de un canal de K^+ (Ito y otros, 1994; Etcheberrigaray y otros, 1994; Hirashima, y otros, 1996; Gibson y otros, 1996; Etcheberrigaray y otros, 1998). Se ha informado que proteínas críticas, tales como la proteína precursora de amiloide (APP), presenilina 1 y presenilina 2, cuyas mutaciones se asocian con la patogénesis de la AD, inducen la homeostasis del Ca^{2+} intracelular mediada por la desregulación tanto del receptor de IP3 (IP3R) como del receptor de rianodina (RYR-) (Yoo y otros, 2000; Leissring y otros, 1999; 2000; Mattson y otros, 2000; Barrow y otros, 2000). Se cree que la alteración de la concentración citosólica de Ca^{2+} contribuye a la patofisiología de la AD, que incluye la producción aumentada del péptido β -amiloide neurotóxico de 42 aminoácidos ($\text{A}\beta$) implicado en la formación de placas, la hiperfosforilación de la proteína tau implicada en la formación de los ovillos neurofibrilares, y la vulnerabilidad general aumentada de las neuronas a la muerte celular.

La bradiquinina (BK) es un nonapéptido vasoactivo eficaz que se genera en el transcurso de diversos estados inflamatorios. La BK se une a uno o varios receptores de BK de membrana celular específicos y activa los mismos, desencadenando, de este modo, una cascada de procesos intracelulares que conducen a la fosforilación de proteínas conocidas como "proteína quinasa activada por mitógeno" (MAPK; véase a continuación). La fosforilación de proteínas, la adición de un grupo fosfato a un residuo de Ser, Thr o Tyr, está mediada por un gran número de enzimas conocidos colectivamente como proteínas quinasas. Normalmente, la fosforilación modifica la función de una proteína, y habitualmente activa la misma. La homeostasis requiere que la fosforilación sea un proceso transitorio, que se invierte mediante enzimas fosfatasas que desfosforilan el sustrato. Cualquier aberración en la fosforilación o desfosforilación altera las vías bioquímicas y múltiples funciones celulares. Dichas alteraciones pueden ser la base de ciertas enfermedades del cerebro.

Los niveles aumentados de Ca^{2+} intracelular como respuesta a BK están mediados, como mínimo por el receptor de BK de "tipo 2" (BKb2R), un receptor acoplado a la proteína G. La estimulación de BKb2R por BK activa la fosfolipasa C (PLC) dando como resultado la producción de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), segundos mensajeros implicados en la regulación de los niveles de Ca^{2+} intracelular y la activación de la proteína quinasa C (PKC). La vía PLC/fosfolípido/PKC también interacciona con la vía de señalización de Ras que activa la vía de MAPK. MAPK (o MAP quinasa) se refiere a una familia de enzimas denominada "proteína quinasa activada por mitógeno", un miembro importante de la cual es la "quinasa extracelular regulada por señal" de tipo 1 ó 2 ("Erk1/2") (Berridge, 1984; Bassa y otros, 1999). Erk1/2 recibe señales de múltiples vías de transducción de señal y forma parte de una vía que conduce a la proliferación celular y a la diferenciación mediante la regulación de la expresión génica a través de varios factores transcripcionales, entre los que se incluye (CREB), la proteína de unión al elemento de respuesta al monofosfato de adenosina cíclico (AMPc).

Erk1/2 fosforila la proteína tau en múltiples sitios Ser/Thr, entre los que se incluyen Ser262 y Ser356 (Reynolds y otros, 2000), que se encuentran en las regiones de unión a microtúbulos de tau. La fosforilación de Ser262 compromete notablemente la capacidad de tau de organizar y estabilizar los microtúbulos (Biernat y otros, 1993; Lu y otros, 1993). El estrés oxidativo aumentado, la expresión aberrante de la proteína precursora de amiloide (APP), y la exposición a $\text{A}\beta$ provoca la activación de MAPK (McDonald y otros, 1998; Ekinci y Shea, 1999; Grant y otros, 1999) y la fosforilación aumentada de tau (Greenberg y otros, 1994).

Young LT y otros, *Neurosci Lett*, 1988, 94:198-202 estudiaron los sitios de unión del receptor de IP3 en cerebros autopsiados de 10 individuos con AD y 10 controles de las mismas edades. En el córtex parietal y el hipocampo, había una pérdida del 50-70% de unión de [^3H]-IP3, mientras que no se observaron cambios significativos en las cortezas frontal, occipital y temporal, caudado o amígdala. El análisis de Scatchard confirmó una reducción de la densidad del receptor en lugar de un cambio de la afinidad. Además, muchos neurotransmisores, hormonas y factores del crecimiento actúan en receptores de membrana para estimular la hidrólisis por fosfodiesterasas del fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP2), generando los comensajeros IP3 y diacilglicerol (DAG). El DAG estimula la PKC, mientras que inicialmente se postuló que el IP3 activa receptores específicos conduciendo a la liberación de calcio intracelular, probablemente del retículo endoplásmico.

Aunque informes anteriores habían detectado unión de ^{32}P -IP3 a microsomas del hígado y adrenales y a neutrófilos y células del hígado permeabilizados, el grupo de Solomon Snyder fue el primero en localizar, aislar, analizar y posteriormente, clonar receptores de IP3. Worley PF y otros, *Nature* 1987; 325:159-161, demostraron sitios de unión selectivos, de elevada afinidad para IP3 marcado con ^3H - y ^{32}P - en el cerebro a niveles 100-300 veces superiores que los observados en tejidos periféricos. Estos receptores se consideraron relevantes fisiológicamente ya que las eficacias de algunos análogos de mioinositol en el sitio de unión a IP3 correspondieron a sus eficacias en la liberación de calcio de los microsomas. Los autorradiogramas de cerebro demostraron una localización de los receptores de IP3 discreta y heterogénea. En 1988, este grupo (Supattapone S y otros, *J Biol Chem*, 1988, 263: 1530-1534), informó de la solubilización, purificación hasta homogeneidad, y caracterización de un receptor de IP3 de cerebelo de rata. El receptor purificado era una proteína globular que migró en electroforesis como una banda de proteína con un Mr de 260 kDa. En una revisión, Snyder y otros (*Cell Calcium*, 1989, 10:337-342) indicaron que los estudios inmunohistoquímicos con antisuero a la proteína de receptor purificada localizaron el receptor en una subdivisión del retículo endoplásmico rugoso que se encontraba en áreas sinápticas y en asociación estrecha con la membrana nuclear. La proteína del receptor de IP3 se fosforiló selectivamente mediante una proteína quinasa dependiente de AMPc. Esta fosforilación disminuyó 10 veces la eficacia de IP3 en liberar calcio de las membranas del cerebro. Ferris CD y otros, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991 88:2232-2235 estudiaron posteriormente la fosforilación de los receptores de IP3 con proteína de receptor purificada reconstituida en liposomas (para eliminar el detergente que puede inhibir las proteínas quinasas). El receptor de IP3 se fosforiló estequiométricamente mediante proteína quinasa C (PKC) y CaM quinasa II, así como mediante proteína quinasa A (PKA). Los receptores de IP3 están regulados mediante fosforilación catalizada por los tres enzimas, lo cual fue aditivo e implicó diferentes secuencias de péptidos. La fosforilación mediante (1) PKC, la cual fue estimulada por Ca^{2+} y DAG, y (2) mediante CaM quinasa II que requería Ca^{2+} , dio a conocer medios por los cuales el Ca^{2+} y DAG, formado durante el recambio de los fosfolípidos de inositol, regula los receptores de IP3. Chadwick CC y otros, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990 87:2132-2136, describieron el aislamiento a partir de músculo liso de un receptor de IP3 que era un oligómero de un polipéptido aislado con un Mr de 224 kDa. Furuichi T, y otros, *FEBS Lett*, 1990 267:85-88 examinaron la distribución del ARNm del receptor de IP3 en tejidos de ratón. La mayor concentración del mismo se encontró en el tejido cerebelar. Se encontraron cantidades moderadas del ARNm del receptor de IP3 presentes en otros tejidos, que no eran del cerebro: timo, corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón y útero. Se observaron cantidades pequeñas del ARNm del receptor de IP3 en músculo esquelético y tejido testicular. En base a la hibridación *in situ*, se localizó una cantidad considerable del ARNm del receptor de IP3 en células del músculo liso, tales como las de las arterias, bronquiolos, oviducto y útero. Ferris CD y otros, *J Biol Chem*, 1992, 267:7036-7041, demostraron la autofosforilación de serina del receptor de IP3 purificado y reconstituido y encontraron actividad de proteína serina quinasa del receptor de IP3 hacia un sustrato peptídico específico. Los investigadores concluyeron que la proteína del receptor de IP3 y la actividad de fosforilación residen en la misma molécula. Ross CA y otros (*Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:4265-4269) clonaron tres ADNc de IP3R, denominados IP3R-II, -III, y -IV, a partir de una biblioteca de ADNc de placenta de ratón. Los tres mostraron una fuerte homología en dominios M7 y M8 transmembrana respecto al IP3R-I cerebelar clonado originalmente, con divergencias predominantemente en dominios citoplásmicos. Los niveles del ARNm de los tres IP3Rs adicionales, en general, fueron sustancialmente más bajos que los del IP3R-I, con la excepción del tracto gastrointestinal, en el que los niveles fueron comparables. Las células de Purkinje cerebelares expresaron, como mínimo dos, y posiblemente tres IP3Rs diferentes, sugiriendo heterogeneidad de la acción de IP3 dentro de una célula sola. Sharp AH, *Neuroscience*, 1993, 53:927-42, examinó con detalle la distribución de los receptores de IP3 en el cerebro de rata y la médula espinal mediante métodos inmunohistoquímicos. Los receptores de IP3 se encuentran presentes en células, fibras y terminales neuronales en una amplia distribución de áreas a lo largo del CNS, entre las que se incluyen el bulbo olfativo, el núcleo talámico y el cuerno dorsal de la médula espinal, en órganos circumventriculares y estructuras neuroendocrinas, tales como el área postrema, el plexo coroide, el órgano subcomisural, la glándula pineal y la pituitaria. La liberación de Ca^{2+} mediada por el sistema del segundo mensajero fosfoinosítido es importante en el control de diversos procesos fisiológicos. Estudios de los receptores de IP3 en linfocitos (células T) realizados por el grupo de Snyder localizaron estos receptores en la membrana plasmática. El encapsulamiento del complejo receptor de célula T-CD3, que se asocia con la transducción de señal, se acompañó del encapsulamiento de los receptores de IP3. El receptor de IP3 sobre las células T parece ser el responsable de la entrada de Ca^{2+} que inicia las respuestas proliferativas (Khan, AA y otros, *Science*, 1992, 257:815-818).

También con respecto a IP3, Wilcox RA y otros, *Trends Pharmacol Sci*, 1998, 19:467-475, indicaron que la activación mediada por receptor de PLC para generar IP3 es una vía de señalización ubicua en sistemas mamíferos. Una familia de tres monómeros de subtipos de receptores de IP3 forman tetrameros funcionales, los cuales actúan como efectores de IP3, proporcionando un canal con ligando de barrera que permite que los iones de Ca^{2+} se muevan entre compartimentos celulares. Dado que los receptores de IP3 se localizan principalmente, aunque no exclusivamente, en la membrana reticular endoplásmica, el IP3 se considera un segundo mensajero que moviliza Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares, contribuyendo a una diversidad de fenómenos fisiológicos y patofisiológicos. Patel S y otros, *Cell Calcium*, 1999, 25:247-264, revisaron las propiedades moleculares de los receptores de IP3. Se mapearon algunos sitios de unión de Ca^{2+} y un dominio de unión calmodulina- Ca^{2+} dentro del receptor de IP3 de tipo I, y estudios sobre receptores de IP3 cerebelares purificados indicaron un segundo dominio de unión a calmodulina independiente de Ca^{2+} . La sobreexpresión de receptores de IP3 proporcionó más indicios sobre la regulación de las isoformas individuales del receptor de IP3 presentes en las células, y el papel que juegan en la generación de señales de Ca^{2+} dependientes de IP3. Los receptores de IP3 pueden implicarse en procesos celulares, tales como proliferación y apoptosis. Andel-Latif AA. *Exp Biol Med* (Maywood) 2001 Mar; 226(3):153-63 revisaron las pruebas, tanto de músculo liso no vascular como de vascular, para discutir sobre los nucleótidos cíclicos, AMPc y GMPc, a través de sus proteínas quinasas respectivas, y las vías de señalización dependientes de Ca^{2+} e independientes de Ca^{2+} implicadas en la contracción inducida por agonista. Éstas incluían la vía de IP3- Ca^{2+} -CaM-quinasa de cadena ligera de la miosina (MLCK) y las

vías independientes de Ca^{2+} , que incluyen PKC, MAP quinasa y Rho-quinasa. Mikoshiba K y otros, Sci STKE 2000 Sep 26; 2000(51):P, describieron la liberación regulada de calcio desde depósitos intracelulares mediante el receptor de IP_3 y la relación de este mecanismo de liberación con el influjo de calcio desde el medio extracelular a través de los canales de calcio accionados por las reservas. Dieron a conocer un modelo de acoplamiento funcional y físico de los canales de calcio intracelulares y de membrana plasmática.

Aunque la AD se conoce bien por sus daños cerebrales graves y pérdida de memoria, los cambios patológicos se manifiestan en cualquier parte del cuerpo y se pueden detectar a nivel celular. Los fibroblastos de la piel que se extienden en la capa profunda de la piel revelan anomalías celulares y moleculares características del daño de la AD. Los fibroblastos de la piel se obtienen y cultivan fácilmente para objetivos de diagnóstico (Patente U.S.A. 6.107.050 "Prueba de diagnóstico para la Enfermedad de Alzheimer", ("Diagnostic Test for Alzheimer's Disease"), editada el 22 de agosto de 2000, la cual se incorpora en la presente como referencia). Sin embargo, hay una necesidad de métodos más simples, económicos, precisos y fiables para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

Se sabe, por ejemplo, a partir de la patente U.S.A. 6.107.050, Alkon y otros, que se pueden medir los efectos diferenciales de un activador de la liberación de Ca^{2+} intracelular. Tanto los tipos de células sanas como las de Alzheimer muestran una liberación de calcio desde los depósitos, pero las células de Alzheimer muestran una liberación mucho mayor. Entre los métodos conocidos para la medición de la liberación de Ca^{2+} (i) se incluyen los indicadores de fluorescencia, los indicadores de absorbancia o un electrodo de pinzamiento zonal ("patch clamp") de Ca^{2+} , y otros, y dichos métodos se pueden utilizar para objetivos de diagnóstico. Sin embargo, existe una enorme necesidad de técnicas más eficaces para la medición de efectos diferenciales de los activadores de IP_3R , para objetivos de diagnóstico, investigación y clínicos.

Características de la invención

La presente invención da a conocer un método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un paciente que comprende la detección de la presencia o ausencia de un nivel anormalmente elevado de una proteína indicadora fosforilada en células de un paciente después de la activación de las células con un compuesto que estimula la fosforilación de la proteína indicadora, indicando la presencia de dicho nivel elevado un diagnóstico positivo para la enfermedad de Alzheimer.

El método de diagnóstico comprende la medición del nivel de fosforilación de una proteína indicadora en células del paciente a un tiempo predeterminado después de la estimulación de las células con un compuesto activador, y la determinación por comparación de los estímulos anormalmente elevados con un nivel de fosforilación basal sin estímulos.

La presente invención da a conocer un método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un individuo, comprendiendo dicho método las etapas de la reivindicación 1.

El método según la presente invención implica, en células del individuo, la medición de un nivel de fosforilación de fondo de una proteína de la vía de señalización del calcio indicadora, cuya fosforilación se asocia con un aumento de Ca^{2+} sensible a $\text{IP}_3\text{-R}$ en las células; la estimulación de las células del individuo mediante el contacto con un agonista de IP_3R que provoca una respuesta diferencial en el nivel de fosforilación de la proteína indicadora en las células de individuos con Alzheimer, en comparación con el nivel de una célula de control sin Alzheimer; a continuación, la medición de un nivel de fosforilación de la proteína indicadora en las células que se han puesto en contacto, y la determinación de si el nivel de fosforilación de respuesta de la proteína indicadora, comparado con el nivel de fondo, coincide con el nivel de respuesta conocido para una célula de individuos con Alzheimer o con el de una célula sana de control.

Los métodos pueden comprender, en primer lugar, la medición del nivel de fosforilación de fondo de la proteína indicadora en un cultivo de células, a continuación, la adición del agonista de IP_3R al cultivo, y la medición del nivel de fosforilación de respuesta. O bien, el método puede comprender la medición del nivel de fondo en una primera alícuota de células, la estimulación de una alícuota similar de las células, y la medición del nivel de respuesta en la alícuota.

El compuesto activador podría ser un agonista de $\text{IP}_3\text{-R}$ seleccionado del grupo que comprende bradiquina, bombesina, colecistoquinina, trombina, prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ y vasopresina.

Las células se pueden seleccionar del grupo que comprende fibroblastos, células de mucosa bucal, neuronas, y células sanguíneas.

En los métodos inventivos, la medición puede comprender un inmunoensayo de células alteradas, y las células del individuo se pueden poner en contacto con un anticuerpo específico de la proteína indicadora fosforilada, permitiendo la unión del anticuerpo a la proteína indicadora, y la detección del anticuerpo unido a la proteína indicadora. El inmunoensayo puede ser un radioinmunoensayo, un ensayo de transferencia Western, un ensayo de inmunofluorescencia, un inmunoensayo enzimático, un ensayo de inmunoprecipitación, un ensayo de quimioluminiscencia, un ensayo inmunohistoquímico, un ensayo de transferencia de puntos ("dot-blot"), o un ensayo de transferencia de líneas ("slot blot").

El método inventivo puede comprender poner en contacto una muestra de proteína de las mencionadas células estimuladas y/o las mencionadas células no estimuladas con un anticuerpo que reconoce una forma no fosforilada de dicha proteína indicadora, y la detección de la unión de dicho anticuerpo y la proteína indicadora no fosforilada, y la normalización del nivel de proteína. La etapa de comparación puede incluir, además, la etapa de obtención de una muestra de proteína a partir de las mencionadas células estimuladas y las mencionadas no estimuladas.

En los métodos de la presente invención, el agente puede ser bradiquinina o un agonista del receptor de bradiquinina, o bombesina, y puede ser un agonista que induce la liberación de Ca^{2+} mediada por IP3.

La cantidad de fosforilación se puede medir en un único tiempo después de la etapa de contacto. Según la presente invención, la medición puede comprender la medición de la cantidad de fosforilación en una primera alícuota de las células del individuo en un primer tiempo después de la etapa de contacto, y la medición de la cantidad de fosforilación en una segunda alícuota de las células del individuo en un segundo tiempo después de la etapa de contacto. Los tiempos pueden ser aproximadamente 0,5 minutos o menos, 1 minuto, 2 minutos, 2,5 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 45 minutos, o 1 hora, o más para algunas combinaciones de tipos de células, activadores, y proteínas indicadoras.

Las células son típicamente de tejido periférico, tal como fibroblastos de piel.

La etapa de medición en los métodos inventivos comprende, opcionalmente, la detección de fosforilación en un lisado de las células del individuo, *in vitro*, y puede comprender electroforesis en gel, transferencia Western, utilizando un anticuerpo anti-fosfo-MAPK y/o un anticuerpo anti-proteína MAPK normal.

La fosforilación aumentada puede ser un aumento de la cantidad de proteína fosforilada en un único tiempo o un incremento en la duración de la proteína fosforilada.

Los métodos son eficaces para el diagnóstico en los casos en los que el individuo carece de las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Alzheimer.

Según la presente invención, los métodos pueden comprender, además, poner en contacto las células del individuo con uno o más inhibidores seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor de la actividad de la proteína quinasa C, un inhibidor de la actividad de la PI-3 quinasa, un inhibidor de la actividad de la proteína C-src tirosina quinasa, un inhibidor del receptor de IP-3 y un inhibidor de una proteína fosfatasa. Además, a modo de caracterización de una realización particularmente exigente de la presente invención, los métodos se pueden caracterizar por tener la fosforilación aumentada inhibida al poner en contacto las células del individuo con un inhibidor seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de la actividad de la proteína quinasa C, de la actividad de la proteína C-src tirosina quinasa, de la actividad de la PI-3 quinasa, y del receptor de IP-3. En dichos métodos los mencionados inhibidores son BiSM-1, PPI, o borato de 2-aminoetoxidifenilo.

La presente invención también da a conocer un método para el cribado de compuestos para la identificación de un compuesto útil para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer que comprende:

poner en contacto células de prueba de un individuo con AD con un compuesto que se está cribando,

estimular las células de prueba antes, durante o después de la etapa de contacto, con un agente que provoca la liberación de calcio intracelular a través del receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3),

medir la cantidad de fosforilación de una proteína MAPK en las células de prueba en uno o varios tiempos después de la estimulación de las células de prueba,

comparar la cantidad de fosforilación de la proteína MAPK en las células de prueba en el tiempo o tiempos con la cantidad de fosforilación en el mismo tiempo o tiempos en células de control de un individuo con AD que no se han puesto en contacto con el compuesto, y

aceptar un compuesto que inhibe o evita la fosforilación aumentada como compuesto principal, y el rechazo de un compuesto que no inhibe o evita la fosforilación aumentada. De la misma forma que en todos los métodos de la presente invención, el agente puede ser bradiquinina o un agonista del receptor de la bradiquinina y la proteína MAPK puede ser Erk1/2. Los métodos pueden comprender la medición de la cantidad de fosforilación en un único tiempo después de la etapa de contacto.

Otra realización da a conocer un método de cribado de compuestos para su utilidad como compuestos activadores en un ensayo de respuesta a estímulos, que comprende la medición del efecto del compuesto sobre la fosforilación de una proteína indicadora en células AD y células de control y la selección de un compuesto que aumenta la fosforilación de la proteína indicadora en cantidad y/o duración en células AD, en comparación con células de control.

Otra realización de la presente invención es un equipo de prueba de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer que comprende un anticuerpo anti-fosfo-proteína MAPK y bradiquinina.

La presente invención también da a conocer la utilización de un inhibidor de la fosforilación de MAPK, tal como se define en la reivindicación 11.

Mediante esta utilización, la enfermedad de Alzheimer se puede tratar o prevenir en un individuo, comprendiendo la administración de una cantidad eficaz de dicho medicamento que

(a) inhibe o previene la fosforilación anormalmente aumentada de una proteína MAPK en células del individuo, en comparación con las células de control; y/o

(b) inhibe procesos provocados por la fosforilación anormalmente aumentada de dicha proteína MAPK.

En particular, la presente invención da a conocer un método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un individuo, que comprende las etapas de la reivindicación 9.

El método también puede comprender poner en contacto las células del individuo con uno o más inhibidores seleccionados del grupo que comprende el inhibidor de la actividad de la proteína quinasa C, BiSM-1, el inhibidor de la actividad de la proteína C-src tirosina quinasa, PP1; y el inhibidor del receptor de IP-3, borato de 2-aminoetoxidifenilo, en el que el aumento en la cantidad de Erk1/2 fosforilada inducido por bradiquinina en las células del individuo en comparación con las células de control, se reduce por dicho inhibidor.

Otra realización de la presente invención da a conocer un método para el cribado de compuestos para la identificación de un compuesto útil para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer que comprende:

(a) poner en contacto fibroblastos de piel de prueba de un individuo con AD con el compuesto que se está cribando;

(b) poner en contacto fibroblastos de piel de control de dicho individuo con un agente de control para dicho compuesto o incubar dichos fibroblastos de control en ausencia de dicho compuesto o bien de dicho agente de control;

(c) estimular antes, durante, o después de la etapa (a) y (b) los fibroblastos de prueba y de control con una concentración eficaz de bradiquinina, estimuladora de fosforilación,

(d) medir la cantidad de Erk1/2 fosforilada en los fibroblastos de prueba y de control en uno o más tiempos seleccionados del grupo que comprende 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, y 30 minutos, mediante transferencia Western utilizando un anticuerpo específico de fosfo-Erk1/2, en el que la cantidad de Erk1/2 fosforilada se normaliza a la cantidad de proteína presente en dichos fibroblastos de prueba y de control;

(e) comparar la cantidad de Erk1/2 fosforilada en los fibroblastos de prueba con la cantidad de Erk1/2 fosforilada en los fibroblastos de control, para determinar si el compuesto inhibe o evita el aumento inducido por bradiquinina en la fosforilación de Erk1/2 en las células de prueba en comparación con las células de control,

en el que un compuesto que inhibe o evita la fosforilación aumentada se identifica como útil para el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer.

Según la presente invención se utiliza un inhibidor de la fosforilación de MAPK para la preparación de un compuesto farmacéutico para la reducción de la proteólisis de la proteína precursora de amiloide, la secreción de la proteína amiloide β , y/o la fosforilación de la proteína tau en una célula humana, teniendo la célula una fosforilación aumentada de la proteína MAPK mediada por el receptor de IP3 en comparación con una célula humana de control, que comprende poner en contacto la célula con un inhibidor de la fosforilación de MAPK eficaz para reducir la fosforilación al nivel en la célula de control para tratar, de este modo, la enfermedad de Alzheimer, definiéndose la inhibición de la fosforilación de MAPK en la reivindicación 11.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A1, 1A2 y 1B. Transcurso del tiempo de la activación estimulada por BK de Erk1/2. Se trataron células de AD y células de controles normales de la misma edad ("AC") con BK 10 nM a diferentes tiempos y las reacciones se acabaron, tal como se describe en los Ejemplos. Para el control, a cada línea de células se añadió el mismo volumen de PBS. Las imágenes superiores representaron membranas de transferencia Western para Erk1/2 activada (P-Erk1/2) de células AD y AC. La densidad media de cada muestra se normalizó a la cantidad total de proteína, la cual se determinó utilizando un anticuerpo anti-"MAP quinasa normal" (R-Erk1/2). Se evaluó la significancia estadística de los valores de 11 líneas de células independientes mediante una prueba t-Student para muestras independientes. Los resultados se resumen y presentan en el gráfico inferior.

Figuras 2A y 2B. Diagrama de puntos que compara la fosforilación de Erk1/2 entre células AD y AC después de 10 minutos de estimulación con BK (Figura 2A). Se trataron células de 20 pacientes con AD y 22 controles de las mismas edades con BK y se procesaron, tal como se describe en la descripción de la Figura 1. Se detectaron la Erk1/2 activada y total mediante transferencia Western con anticuerpos adecuados. Los resultados se procesaron y analizaron, tal como se ha descrito para la Figura 1. La figura 2B muestra la fosforilación de Erk1/2 estimulada por BK de tres replicaciones independientes para cada línea de células seleccionada al azar.

Figuras 3A1, 3A2, 3B1 y 3B2. Tinción inmunocitoquímica de Erk1/2 activada en los fibroblastos humanos. Se cultivaron fibroblastos de pacientes con AD y de los controles de las mismas edades sobre cubreobjetos de vidrio y se estimularon con BK 10nM durante 10 minutos. Se detectó la Erk1/2 activada con un anticuerpo anti-fosfo-Erk1/Erk2. Los resultados mostraron que no había una diferencia aparente en las células AC (imagen superior) entre el pretratamiento con BK y después del mismo. Sin embargo, en las células AD, se observaron señales inmunofluorescentes fuertemente aumentadas (imagen inferior derecha, 3B2) en las células tratadas con BK (10 minutos).

Figuras 4A1, 4A2, 4B1, 4B2, 4C1, 4C2, 4D1 y 4D2. Efectos de diferentes inhibidores sobre la activación de Erk1/2 estimulada por BK: Se preincubaron fibroblastos de pacientes con AD y los controles con las mismas edades, respectivamente, a 37°C con 2APB 50 μ M durante 30 minutos (Figura 4A); BiSm-1 5 μ M durante 15 minutos (Figura 4B); PP1 10 μ M durante 15 minutos (Figura 4C) y LY294002 5 μ M durante 15 minutos (Figura 4D). Se incubó un segundo matraz de células de cada línea de células con un volumen idéntico de vehículo de DMSO. Al final de la incubación, las células se trataron con BK 10 nM durante 5 minutos antes de que la reacción se hubiera acabado. Las formas activada y "normal" de Erk1/2 se detectaron, a continuación, en membranas de transferencia Western con los dos anticuerpos descritos anteriormente. Los paneles de la izquierda muestran las membranas de transferencia Western representativas y los gráficos de la derecha resumen los resultados de las 11 líneas de células tanto de AD como de AC. ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$.

Figuras 5A, 5B1, 5B2, 5C1 y 5C2. Cambios en la fosforilación de CREB, y cantidades de la misma después de la estimulación con BK. Se trataron células AC y AD con BK 10 nM durante 5 ó 10 minutos. Se midió la CREB fosforilada (P-CREB) mediante un anticuerpo anti-fosfo-CREB-Ser133 sobre las membranas de transferencia Western. Se normalizaron las densidades medias de P-CREB contra la cantidad total de CREB medida utilizando un anticuerpo anti-"CREB normal" y se sometieron a análisis estadísticos. La Figura 5A muestra la fosforilación de CREB inducida por BK a los 5 y 10 minutos después del tratamiento. La Figura 5B muestra una membrana de transferencia representativa de P-CREB a los 10 minutos después del tratamiento con BK. La Figura 5C muestra que la cantidad total de CREB se redujo significativamente después de 10 minutos de tratamiento con BK.

Figuras 6A1, 6A2, 6B1, 6B2, 6C1 y 6C2. Efectos de diferentes inhibidores sobre la fosforilación de CREB estimulada por BK. Se preincubaron células AC y AD a 37°C durante 15 minutos con BiSM-1 5 μ M (Figura 6A), PP1 10 μ M (Figura 6B), o Ly294002 5 μ M (Figura 6C) antes de la incubación con BK 10 nM durante 10 minutos. La normalización se llevó a cabo de la misma forma que para las Figuras 5A-5C y se evaluó la significancia estadística de las diferencias mediante ANOVA de 2 vías. ** $p < 0,0001$; * $p < 0,05$.

Figuras 7A y 7B. Distribución del receptor de BKb2 en los fibroblastos de piel de humanos. Se incubaron fibroblastos con un anticuerpo anti-receptor de BKb2 seguido de un anticuerpo secundario marcado con fluoresceína. El panel superior muestra la imagen por contraste de interferencia diferencial (DIC) de las células, y el panel inferior muestra la inmunofluorescencia del receptor de BK b2 en fibroblastos.

Figura 8. El efecto de la bradiquinina sobre la fosforilación de Erk1/2 en fibroblastos de individuos con demencia de Huntington (HD). N=4 y P=0,39, prueba t.

Descripción detallada de la invención

Según la presente invención, un activador, o agente que estimula una liberación de calcio intracelular mediada por IP3 es aquél que un experto en la técnica puede identificar utilizando métodos descritos en la presente, basados en la información publicada sobre el receptor de IP3 y las vías relacionadas, tal como se describe en los antecedentes.

Un nivel o proporción de fosforilación estimulada/no estimulada anormalmente elevado significa aquél que excede un nivel determinado previamente para células sin enfermedad de Alzheimer conocidas en un tiempo predeterminado, en una cantidad que es estadísticamente característica de forma significativa de las células con enfermedad de Alzheimer y no característica de células sin enfermedad de Alzheimer.

El término proteína indicadora, o proteína MAPK, utilizado en la presente, generalmente, de forma intercambiable, significa una proteína que se fosforila como parte de la vía de señalización del calcio, como respuesta a la administración de un compuesto activador, y cuyo grado de fosforilación es diferencialmente superior en células AD respecto a células de control. La proteína indicadora puede ser una proteína de la vía de señalización del calcio cuya fosforilación se asocia con el aumento de Ca^{2+} sensible a IP3R en las células. Las proteínas indicadoras/MAPK incluyen aquellas que se fosforilan como respuesta a la liberación de calcio mediada por IP3R, tal como Erk1/2.

La activación o estimulación de las células significa que las células intactas se ponen en contacto con el activador *in vitro*, típicamente mediante la adición de una solución que contiene el compuesto activador, o de otra manera que conocería un experto en la técnica.

Un compuesto activador es aquél que, tras la introducción en células humanas, estimula la fosforilación de la proteína indicadora. Los compuestos activadores provocan una respuesta diferencial en el nivel de fosforilación de la proteína indicadora en células de individuos con Alzheimer, comparado con el nivel en células de control de un individuo sin Alzheimer. Los compuestos activadores son eficaces cuando se liberan en un medio de cultivo de células. Se puede hacer referencia a los compuestos activadores como agonistas de IP3R porque inducen un aumento de Ca^{2+} intracelular mediado por IP3R, directa o bien indirectamente.

El nivel de fosforilación de una proteína indicadora se determina generalmente midiendo la cantidad de proteína indicadora fosforilada y, opcionalmente, de proteína indicadora no fosforilada, y normalizando la cantidad de proteína fosforilada al total de proteína indicadora en la muestra que se está analizando. El nivel de fosforilación de respuesta calculado y los niveles de fosforilación basales o de fondo, de este modo, no se ven afectados por las diferencias en la cantidad absoluta de la proteína indicadora en un tiempo determinado.

El tiempo discriminatorio, o tiempo predeterminado tras la estimulación de las células con el compuesto activador se selecciona para conseguir una diferencia significativa estadísticamente entre el nivel de fosforilación de la proteína indicadora en células AD conocidas y células de control conocidas. La diferencia puede ser máxima en el tiempo predeterminado pero esto no es necesario y depende de otros parámetros de la prueba.

Para cualquier compuesto activador determinado, existe un número finito de proteínas indicadoras adecuadas y viceversa. Según la presente invención, el compuesto activador y la combinación de proteína activadora se selecciona de tal modo que el activador provoca una respuesta diferencial en el nivel de fosforilación de la proteína indicadora en células de individuos con Alzheimer en comparación con el nivel en células de control sanas en un tiempo predeterminado tras el contacto de las células con el activador. Un experto en la técnica puede seleccionar proteínas indicadoras y compuestos activadores adecuados determinando si tiene lugar una fosforilación diferencial de este tipo. Habiendo seleccionado un conjunto de proteínas indicadoras y de compuestos activadores, los parámetros de ensayo se pueden optimizar, tal como el tiempo discriminatorio, las concentraciones adecuadas de la proteína y el activador, los anticuerpos adecuados para las fosfoproteínas o proteínas no fosforiladas, u otros medios de detección, y así sucesivamente.

Por supuesto, el cálculo de una proporción del nivel de fosforilación activada con respecto al nivel de fosforilación basal se puede invertir. Es decir, por conveniencia, los presentes inventores hacen referencia a la proporción activada/basal que es superior al nivel conocido, para los expertos en la técnica resulta claro que la inversión del numerador y denominador en la proporción da el mismo resultado si se considera el punto de vista desde la perspectiva de la fosforilación inactivada inferior al nivel conocido. De este modo, en los casos en los que en la presente el cálculo de la proporción se describe de un modo se debe comprender que incluye el cálculo a la inversa, tal como resulta claro para un experto. Además, mientras que el cálculo de proporciones, tal como se describe en la presente, es beneficioso para proporcionar números comparativos útiles, también podría utilizarse el cálculo de las diferencias absolutas entre niveles de fosforilación activada y basal y entre individuos de prueba e individuos de control, y sería eficaz, según la presente invención.

Las proporciones determinadas anteriormente para células con enfermedad de Alzheimer conocidas y células sin enfermedad de Alzheimer en el tiempo predeterminado o discriminatorio se pueden escribir en un gráfico o mostrar en una base de datos informática, a partir de los cuales se pueden determinar los resultados del diagnóstico. Por consiguiente, en la práctica se lleva a cabo una prueba de diagnóstico, se calcula una proporción de fosforilación activada/basal y si la proporción calculada es igual o superior a la proporción determinada anteriormente para células con enfermedad de Alzheimer conocidas, el diagnóstico es positivo. Si la proporción calculada es inferior a la proporción determinada anteriormente para células sin enfermedad de Alzheimer conocidas, el diagnóstico es negativo.

La presente invención da a conocer una prueba de diagnóstico para la AD que comprende la medición de la respuesta de una proteína MAP quinasa (MAPK) frente a la estimulación con BK. La respuesta en células AD se compara a la respuesta en células de controles de la misma edad (que pueden incluir individuos con otras enfermedades, entre las que se incluyen otras enfermedades asociadas con la demencia). En una realización preferente, la prueba se basa en la detección de fosforilación anormalmente alta de Erk1/Erk2 en fibroblastos de piel como diagnóstico de la presencia de AD (tanto de tipo familiar como no familiar) tras la estimulación de las células con BK. La evaluación de la fosforilación puede ser mediante transferencia Western u otras tentativas.

La fosforilación es una reacción bioquímica en la que un grupo fosfato se añade a residuos de Ser, Thr o Tyr de una proteína y es catalizada por enzimas proteína quinasa. La fosforilación habitualmente modifica las funciones de proteínas diana, provocando generalmente la activación. Como parte de los mecanismos homeostáticos de las células, la fosforilación es solamente un proceso transitorio que se invierte mediante otros enzimas llamados fosfatasas. Cualquier aberración en cualquier sentido de la reacción (fosforilación frente a desfosforilación) puede alterar la función celular. Estas alteraciones pueden ser los pilares fundamentales de varias enfermedades del cerebro.

Según la presente invención, se puede eliminar la actividad de fosforilación anormal que produce una fosforilación aumentada de las proteínas indicadoras en respuesta a los moduladores de la vía de señalización del calcio en pacientes con AD en un análisis de diagnóstico. La anomalía es un aumento o disminución de la fosforilación a un tiempo determinado con respecto a los niveles en células de pacientes sanos. La detección de diferencias específicas de la AD en MAPK en cualquier tejido periférico (es decir, fuera del sistema nervioso central) sirve de base para una prueba económica para el diagnóstico temprano de la AD y para el cribado e identificación de dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos. De este modo, la presente invención da a conocer métodos, reactivos, y equipos para la detección de la presencia o ausencia de AD.

Los enzimas MAPK juegan un papel fundamental en la transmisión de señales extracelulares al núcleo de la célula, conduciendo al control de la expresión de genes. También están implicados en la regulación de la fosforilación de la proteína tau asociada a los microtúbulos y la generación y secreción de la proteína β amiloide, procesos críticos para

la patogénesis de la AD. Según la presente invención, la fosforilación prolongada anormalmente de la MAPK Erk1/2 tiene lugar en los fibroblastos con AD y se detecta en los mismos, como respuesta a la estimulación mediante BK, cuando se compara con controles de las mismas edades.

Aunque los presentes inventores dirigieron sus pruebas iniciales con BK como estímulo, se debe comprender que la BK sólo representa una forma de conseguir la estimulación de los receptores celulares de IP3. Por consiguiente, se debe interpretar que la referencia a BK en la presente abarca otros compuestos activadores o estímulos adecuados. Esta estimulación sirve como etapa común que da como resultado la fosforilación aumentada de Erk1/2, característica de la AD. De hecho, se observó que la inhibición del receptor de IP3, suprimía totalmente la fosforilación de Erk1/2 estimulada por BK, sugiriendo que la liberación de Ca^{2+} sensible a IP3 explica este resultado. Los aumentos específicos de la AD en la fosforilación de Erk1/2 también se asociaron con la expresión aumentada de genes de las isoformas de la quinasa PKC y MAP quinasa (también conocidas como "quinasa MAPK/Erk o MEK) en células AD, así como la expresión reducida en genes de la fosfatasa 1, 2A y 2B que desfosforilan la proteína tau asociada a los microtúbulos y MAPK. Las alteraciones de la expresión de genes en células AD pueden cambiar el equilibrio de actividades entre proteínas quinasas y fosfatasas, lo cual puede contribuir a esta activación prolongada de Erk1/2, así como a la hiperfosforilación de tau, que forma ovillos neurofibrilares en el cerebro con AD. La detección de estas actividades de Erk1/2 anormales en fibroblastos de piel refleja cambios similares en el cerebro, y de este modo, es un diagnóstico de la patofisiología temprana de la AD.

De este modo, según la presente invención, la estimulación con BK provoca un aumento anormalmente prolongado de la fosforilación de Erk1/2 en fibroblastos con AD, un cambio que depende de la liberación de Ca^{2+} mediada por el receptor de IP3. Mientras la IP3 quinasa parece que está implicada en la fosforilación de Erk1/2 estimulada por BK en células de controles sin AD, esta fosforilación de Erk1/2 en las células AD es independiente de IP3 quinasa.

El aumento específico de la AD en la fosforilación de Erk1/2 fue posterior a la liberación de Ca^{2+} mediada por IP3. La Proteína Kinasa C (PKC) y la proteína c-Src tirosina quinasa (PTK) no receptora están implicadas en la vía de señalización más arriba de la activación de Erk1/2, indicando mediante los resultados que tanto el inhibidor de PKC bisindolilmaleimida-1 como el inhibidor de c-Src, PP1, suprimieron completamente la fosforilación de Erk1/2 estimulada por BK. La PI-3 quinasa, LY924002, inhibió parcialmente la fosforilación de Erk1/2 estimulada por BK en el control, células sin AD, pero no mostró efecto en células AD, sugiriendo que la fosforilación de Erk1/2 inducida por BK puede implicar vías de señalización independientes de la PI-3 quinasa.

También se observó la activación de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB) medida como un aumento de la fosforilación en Ser-133 después de la estimulación con BK. De forma similar a la fosforilación de Erk1/2, la fosforilación de CREB inducida por BK se inhibió totalmente por inhibidores de PKC y c-src, tanto en células AC como en AD. Sólo se inhibió parcialmente la fosforilación de CREB en células AC pero no en AD, por el inhibidor IP-3 quinasa LY-294002.

Estos resultados sugieren un desarreglo de las vías de señalización como respuesta a BK en células AD que conduce a una fosforilación y activación de Erk1/2 anormalmente elevadas y prolongadas, lo cual, a su vez, altera procesos celulares, tales como la transcripción de genes, el procesamiento de la APP (proteína precursora de amiloide) y la fosforilación de la proteína tau, todos los cuales sustentan la patogénesis de la AD. La comprensión de las alteraciones en estas vías también puede ayudar a explicar la temprana pérdida de memoria que es un sello de la AD. Además, la detección de diferencias específicas de la AD en MAPK en tejidos periféricos proporciona (1) medios eficaces para el diagnóstico temprano de la AD y (2) una base bioquímica para la identificación de agentes terapéuticos para el desarrollo de fármacos.

En vista de lo anteriormente mencionado, y dado que la misma célula puede utilizar diferentes combinaciones de mensajeros para la liberación del Ca^{2+} intracelular para codificar diferentes mensajes externos, cualquier agente que es capaz de estimular los receptores de IP3 para provocar la liberación de los depósitos internos de calcio, se puede utilizar en la prueba de la presente invención, como inductor de la fosforilación aumentada de Erk1/2, característica de las células AD. Nuevamente, BK es sólo uno de dichos agentes, pero otros agonistas del receptor de BK también son útiles de forma similar. También se pueden utilizar moléculas que sean ligandos para el receptor de IP3. Dado que el receptor de IP3 se regula por ATP, calcio, y la fosforilación mediante proteína quinasa A, proteína quinasa C, y proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} calmodulina (CaM quinasa II), agentes que modulan los niveles o actividades del ATP o de estas quinasas pueden conseguir efectos similares y pueden sustituir la BK en la presente invención.

Uno de dichos agentes es el péptido de 14 aminoácidos, bombesina (Anastasi A. y otros, *Arch Biochem Biophys*, 1972, 148:443-446); Woodruff GN y otros, *Ann N Y Acad Sci*, 1996, 780:223-243, o los análogos biológicamente activos o fragmentos de los mismos (Rivier JE y otros, *Biochemistry*, 1978, 17:1766-71; Orloff MS y otros, *Peptides*, 1984 5:865-70; Walsh, JH y otros, *Peptides*, 1985, 6 Supl. 3:63-68). Otro es la colecistoquinina. Para la señalización de calcio inducida por bombesina y colecistoquinina a través de IP3 y los receptores de IP3, véase, por ejemplo, Cook SJ y otros *Biochem J*, 1990, 265:617-620 Schulz I y otros, *Biol Chem*, 1999, 380:903-908; Burdakov D, y otros, *Curr Biol*, 2000, 10:993-996. Aunque la prueba se ejemplifica en la presente utilizando fibroblastos de piel, en la prueba de la presente invención se pueden utilizar otras células que sean igual o más fáciles de obtener y procesar, de este modo, las células sanguíneas, preferentemente linfocitos o monocitos, se preparan fácilmente a partir de sangre periférica y se utilizan según la presente invención. Un experto en la técnica puede calibrar los tiempos y las condiciones experi-

mentales adecuados para obtener un método de diagnóstico basado en dichas células, utilizando proteínas indicadoras y compuestos activadores adecuados.

Los presentes inventores descubrieron que la actividad de un enzima importante, MAPK, que significa proteína quinasa activada por mitógeno (MAP quinasa) se estimulaba durante un intervalo anormalmente prolongado en fibroblastos de piel con enfermedad de Alzheimer, en comparación con células de controles de las mismas edades. Los Ejemplos a continuación, muestran que la fosforilación de Erk1/2 se prolongó en fibroblastos con AD tras la estimulación con BK. La liberación de Ca^{2+} mediada por el receptor de IP3 y la actividad de PKC y de la proteína s-Src tirosina quinasa (PTK) no receptora, son fundamentales para esta fosforilación de Erk1/2. Aunque parece que una IP3 quinasa está implicada en la fosforilación de Erk1/2 estimulada por BK en células AC, la misma fosforilación en células AD es independiente de IP3 quinasa.

Según la presente invención, las células se estimulan con un agente que estimula el receptor de IP3 para liberar calcio intracelular; la BK y sus análogos son ejemplos de dichos agentes. La BK es un nonapéptido eficaz que se une a uno o varios receptores específicos de BK y activa los mismos, lo cual, a su vez, desencadena una cascada de procesos moleculares dentro de la célula, entre los que se incluyen la estimulación del receptor de IP3 y la fosforilación de proteínas MAPK. La fosforilación es una reacción bioquímica en la cual se une un grupo fosfato a una proteína, iniciado por un enzima denominado proteína quinasa; normalmente modifica funciones de las proteínas diana y habitualmente provoca la activación de una proteína. Las células necesitan mantener un sistema equilibrado para sus funciones, de modo que la fosforilación sólo es un proceso transitorio, que necesita ser invertido por otro enzima, denominado fosfatasa. Cualquier aberración en cualquier sentido de la reacción (fosforilación frente a desfosforilación) romperá la integridad de la red molecular y alterará las funciones celulares. Estas alteraciones pueden ser los pilares fundamentales de diversas enfermedades del cerebro.

Una fosforilación de MAPK de larga duración de este tipo en fibroblastos con AD indica una actividad anormalmente aumentada de este enzima en aquellas células. Este efecto específico de AD parece que está relacionado con otras actividades celulares y enzimáticas anormales. La fosforilación de MAPK prolongada fue secundaria frente a la liberación excesiva de Ca^{2+} mediada por receptores de IP3 de un depósito específico dentro de la célula. La fosforilación de MAPK fue dependiente parcialmente de la actividad PI3 quinasa, y se demostró que un mecanismo dependiente de PI3 quinasa estaba implicado en la fosforilación de MAPK en células AD.

Al comparar el perfil de la expresión de genes en células AD con las células de control de las mismas edades, los presentes inventores encontraron que la expresión de PKC y MEK aumentó en células AD. Tanto la PKC como la MEK son moléculas corriente arriba de la vía que catalizan la fosforilación de MAPK. Los presentes inventores también encontraron expresión reducida de varias fosfatasas que desfosforilan MAPK. Por lo tanto, el desequilibrio, es decir, los cambios combinados en las cantidades y actividades de los enzimas que regulan la fosforilación de MAPK explican la diferencia útil para el diagnóstico en células AD - fosforilación de MAPK prolongada.

Este es el primer descubrimiento de actividad MAPK anormalmente aumentada en la AD. La familia de enzimas MAPK desarrolla pasos fundamentales en la señalización de células desde la membrana celular hasta el núcleo. Se estimulan por una variedad de señales (por ejemplo, mitógenos) que actúan a nivel de la superficie celular y conducen a la división celular (mitosis), un proceso necesario para el crecimiento y desarrollo, así como para la sustitución y/o reparación de las células dañadas por lesión o enfermedad.

La MAPK también juega un papel importante en la transmisión de señales en neuronas que sustentan funciones, tales como el aprendizaje y la formación de memoria. La MAPK también regula la secreción del péptido amiloide β AP y la fosforilación de la proteína tau en células del cerebro. La acumulación de β AP fuera de las células nerviosas y la fosforilación excesiva de tau son altamente tóxicas para las neuronas, conduciendo a placas y ovillos neurofibrilares (NFTG), respectivamente. De hecho, estos son dos aspectos patológicos característicos en cerebros con AD.

Según la presente invención, la actividad de MAPK anormalmente aumentada contribuye al procesado de amiloide aberrante y de la función de la proteína tau. Los presentes resultados proporcionan nuevas percepciones de los sustratos moleculares para la formación de memoria normal en el cerebro, así como de la patofisiología de la AD. Esta última comprensión se espera que conduzca a la identificación de nuevas dianas moleculares para la prevención y tratamiento de la enfermedad.

De forma más práctica, los presentes resultados tienen un significado de diagnóstico clínico inmediato. Dado que (a) los fibroblastos de la piel manifiestan alteraciones de la actividad de la MAPK, característica de la AD, tanto la familiar como la no familiar, (b) los fibroblastos de la piel se han obtenido de forma fácil (respecto al tejido del cerebro), una prueba de diagnóstico en base a la MAPK llevado a cabo en fibroblastos de la piel, da a conocer una prueba simple y económica para la diagnosis temprana de la AD.

Los presentes nuevos descubrimientos son coherentes con las conclusiones de otros de que la señalización del calcio excesiva era detectable en fibroblastos con AD estimulados por BK (Ito y otros, 1994; Gibson y otros, 1996; Etcheberrigaray, y otros, 1998).

Ejemplo 1

El presente estudio utilizó fibroblastos de piel de 20 pacientes con AD de edades que oscilaban entre 52-67 años y de 22 controles de las mismas edades. Algunas de las muestras fueron células provenientes de bancos, mientras que otras se recolectaron al momento y se cultivaron a partir de piel humana.

Materiales y métodos

Se compraron fibroblastos de piel provenientes de un banco de pacientes con AD familiar (FAD) y no familiar (nFAD) y de controles de las mismas edades (AC) al Coriell Institute for Medical Research. El medio fue medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco BRL) complementado con suero bovino fetal (FBS; Bio Fluids). La bradiquinina, el difenil borato de 2-aminoetilo (2ABP), los cócteles inhibidores de proteasa y fosfatasa provenían de Sigma; la bisindolilmaleimida-1 (BiSM-1) y el LY294002 provenían de Alexis; el PP1 provenía del Dr. Anthony Bishop, Universidad de Princeton. Los anticuerpos anti Fosfo Erk1/2, anti-fosfo-CREB, y anti-CREB provenían de Cell Signaling Technology. El anticuerpo anti-Erk1/2 provenía de Upstate Biotechnology. Los mini geles en SDS al 4-20% provenían de Invertogene Novex. Las membranas de nitrocelulosa provenían de Schleicher & Schuell. Todos los reactivos de electroforesis en SDS eran de BioRad. El equipo de sustrato quimioluminiscente SuperSignal era de Pierce.

Cultivo de fibroblastos AC y AD: Se mantuvieron fibroblastos provenientes de un banco de pacientes con enfermedad de Alzheimer incluyendo los tipos tanto familiar (FAD) como no familiar (nFAD), y de controles de las mismas edades (AC) y se pasaron a matraces T-25/T75 con el DMEM + FBS al 10%. Las células eran de individuos cuyas edades se encontraban entre 52 y 67 años y más del 80% de las muestras eran de varones. Las células se utilizaron durante los pasajes 6-17.

Procesamiento y cultivo de fibroblastos de biopsias recientes: La colección y cultivo de fibroblastos de tejido de piel acabado de obtener se llevaron a cabo tal como se indica a continuación. Se tomaron tejidos de piel con un punzón de biopsia ("punch biopsy") de pacientes nFAD y los controles de las mismas edades por personal cualificado en el Copper Ridge Institute (Sykesville, MD) y el Hospital Johns Hopkins (Baltimore, MD) bajo un protocolo autorizado. Las muestras se colocaron en 1 x PBS y se transportaron en un medio de transferencia al laboratorio para su procesamiento. El tejido se separó del medio de transferencia, se lavó con PBS y se cortó en explantes de 1 mm. Los explantes se transfirieron individualmente a la superficie de crecimiento de matraces T-25 ventilados con 3 ml de medio de biopsia que contenía FBS al 45% y 100 U/ml de Penicilina y 100 U/ml de estreptomicina (Pen/Strep). Los tejidos se cultivaron a 37°C durante 24 horas anteriormente a la adición de 2 ml de medio de biopsia que contenía FBS al 10%. El medio se sustituyó, después de 48 horas, con 5 ml de medio de cultivo normal que contenía FBS al 10% y Pen/Strep. A continuación, las células se pasaron y se mantuvieron, tal como se ha descrito anteriormente.

Tratamiento de células de fibroblasto con diferentes agentes farmacológicos: Los fibroblastos se trataron con BK, y diferentes inhibidores. Entre éstos se incluyen el inhibidor del receptor de IP3, el difenil borato de 2-aminoetilo (2ABP), el inhibidor de la proteína quinasa C, Bisindolilmaleimida I (BiSM-1), el inhibidor de la proteína C-src tirosina quinasa PP1, y el inhibidor de la PI3 quinasa, LY294002.

Se hicieron crecer fibroblastos AC y AD provenientes de un banco al 80-100% de confluencia antes de que se les "privara de nutrientes" en DMEM libre de suero durante toda la noche. Las células se trataron con BK 10nM a 37°C durante diferentes intervalos para establecer un curso de tiempo para los efectos de la BK. Se añadió el mismo volumen de PBS a un matraz de control de células de cada línea. La reacción se finalizó mediante la eliminación del medio, el lavado rápido de las células con PBS preenfriado, pH 7,4, y la transferencia del matraz a hielo seco/etanol.

Las células de biopsia reciente se incubaron con una concentración óptima de BK, 0,1 nM durante 10 minutos a 37°C.

Para los estudios de inhibición, las células se preincubaron con la siguiente concentración de inhibidor a 37°C durante los intervalos indicados: 2ABP (50 μ M durante 30 minutos); PP1 (10 μ M durante 15 minutos); LY294002 (5 μ M durante 15 minutos); y BiSM-1 (5 μ M durante 15 minutos). Se incubó un matraz de control paralelo con un volumen idéntico de vehículo DMSO. Al final de esta incubación, se añadió el mismo inhibidor a la concentración indicada y fue seguido inmediatamente de BK hasta una concentración final de 10 nM. También se añadió BK (10 nM) a los controles DMSO. Los controles basales fueron células a las cuales no se añadió BK ni inhibidores. Después de una incubación de 5 minutos a 37°C, la reacción se terminó tal como se ha descrito anteriormente.

Los lisados de células se prepararon a partir de células de diferentes grupos. Los matraces se cambiaron del hielo seco/etanol a agua helada. Cada matraz recibió 1 ml de tampón de lisis (Tris 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, pH8, NP-40 al 0,5%, Tritón X-100 al 1%, cóctel inhibidor de proteasa (Sigma) al 1%, cóctel de inhibidor de serina/treonina (Ser/Thr) fosfatasa e inhibidor de tirosina (Tyr) fosfatasa (Sigma) al 1%. Tras la agitación en un agitador de extremo a extremo en una habitación fría durante 30 minutos, las células se recolectaron de cada matraz con un raspador de células. Las células se sonicaron, centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos, y una muestra del sobrenadante se sometió a transferencia Western.

Transferencia Western: Los lisados de células se hirvieron en un volumen igual de 2X tampón de muestra en SDS durante 10 minutos. Las proteínas de cada muestra se resolvieron en un gel de minigradiante al 4-20% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se detectó la Erk1/2 con un anticuerpo anti-fosfo-Erk1/2 mediante el equipo de detección de ECL SuperSignal. A efectos de normalizar la cantidad de Erk1/2 fosforilada frente a la cantidad total de Erk1/2, la misma membrana hibridada con el anticuerpo se separó con un tampón de separación ("stripping buffer") (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,7, SDS al 2% y 2-mercaptoetanol 100 mM) a 60°C durante 45 minutos. Tras el lavado con PBS 10 mM pH 7,4, que contenía un 0,01% de Tween-20 (3x a 10 minutos), la membrana se transfirió con un anticuerpo anti-no fosfo-Erk1/2, lo que permitió el cálculo de la cantidad total de Erk1/2 cargada en el gel.

CREB se detectó utilizando métodos análogos.

Análisis de los datos: Las señales de Erk1/2 (o CREB) fosforilada y no fosforilada se escanearon con un scanner Fujifilm LAS-1000 Plus. La media de la densidad óptica de cada banda de proteína se midió mediante software de Imagen NIH. Los valores de las señales de fosfo-Erk1/2 se normalizaron respectivamente frente la señal total de Erk1/2. Después de la normalización, los datos de células tratadas se convirtieron en porcentaje del control basal y se sometieron a análisis estadísticos.

Inmunocitoquímica: Se hicieron crecer fibroblastos sobre la superficie de cubreobjetos de cristal recubiertos con 0,02 mg % de polilisina. Después del tratamiento con BK, tal como se ha descrito anteriormente, las células se lavaron rápidamente con PBS frío, se fijaron con formaldehído al 4% en PBS a temperatura ambiente durante 15 minutos, se lavaron con PBS 3 veces, 5 minutos cada una, y se penetraron con Tritón X-100 al 0,1% en PBS a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras la incubación con suero de caballo normal en PBS al 10% a temperatura ambiente durante 30 minutos, las células se incubaron con anticuerpo anti-Fosfo-Erk1/2 (1:200) a 4°C durante toda la noche. Los cubreobjetos se lavaron con PBS 3 veces, y se añadió IgG anti-ratón 1:200 marcada con fluoresceína (Vector Lab) y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos. Después de tres lavados con PBS, y del sellado con Vectashield (Vector Lab), se observaron señales de inmunotinción en las células en un microscopio de fluorescencia. La intensidad de las señales fluorescentes se midió con software BioRad Quantity One® (BioRad). Para la localización de los receptores de BK en los fibroblastos, se aplicó un anticuerpo monoclonal anti BK B2 a los fibroblastos normales, seguido de una incubación con IgG anti-ratón conjugada con CY5 y las células se examinaron mediante microscopio de fluorescencia.

Resultados

Activación de Erk1/2 inducida por BK en células AC y AD

La BK produjo la fosforilación marcada, aunque transitoria, de Erk1/2 en fibroblastos de piel humana de individuos de control (Figura 1). El pico de fosforilación tuvo lugar aproximadamente a los 2,5 minutos después de la estimulación, tras los cuales la fosforilación de Erk1/2 disminuyó, y volvió a los niveles de control a los 10 minutos después de la estimulación. A los 20 minutos después del tratamiento con BK, la fosforilación de Erk1/2 fue el 68% del control (Figura 1). Sin embargo, en células de individuos con AD, los niveles aumentados de fosforilación de Erk1/2 se mantuvieron durante un período prolongado marcadamente (Figura 1). Las diferencias fueron estadísticamente significativas (prueba t de Student) a los 5 minutos ($p < 0,01$), teniendo lugar la mayor divergencia a los 10 minutos ($p < 0,0001$). Esta diferencia entre células AD y AC permaneció significativa cuando se midió a los 20 minutos ($P = 0,002$) después de la estimulación con BK.

La Figura 2 muestra los resultados de un estudio en el cual se examinó la fosforilación de Erk1/2 inducida por BK a los 10 minutos después de la estimulación con fibroblastos de piel de muestras de tejido acabado de extraer de pacientes con AD y controles de las mismas edades, así como de líneas de células provenientes de un banco de grupos AD y AC. La fosforilación de Erk1/2 en fibroblastos con AD aumentó de forma constante en comparación con los controles de las mismas edades (Figura 2A). De forma similar, la fosforilación de Erk1/2 estimulada por BK en líneas de células aumentó de forma reproducible en líneas de células AD, tal como se muestra en la Figura 2B, la cual ilustra tres replicaciones independientes (a partir de líneas AC y AD escogidas al azar).

Cuando los fibroblastos se inmunotñeron con anticuerpo anti-P-Erk1/2, se observaron niveles aumentados de Erk1/2 fosforilada en células AD, pero no en células AC, 10 minutos después del tratamiento con BK (Figura 3). Estas señales aumentadas se concentraron en el área para-nuclear (Figura 3, panel inferior derecho).

Efectos del inhibidor del receptor de IP3 2ABP sobre la fosforilación de Erk1/2 inducida por BK

La BK estimula la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos sensibles a IP3 (Cruzblanca y otros, 1998; Pascale y otros, 1999). En el presente estudio, se examinó la implicación de la liberación de Ca^{2+} del receptor de IP3 en la fosforilación de Erk1/2 inducida por BK. La adición de 2ABP, un eficaz inhibidor del IP-3R permeable a la membrana, a las células antes de la BK, suprimió completamente la fosforilación de Erk1/2 estimulada por BK - tanto en células AC como en AD (Figura 4A). La ANOVA de dos vías mostró que los efectos del tratamiento fueron muy significativos ($F_{1,36} = 187,4$, $p < 0,0001$). Este resultado prueba que la fosforilación de Erk1/2 y la posterior cascada molecular se produce más abajo del aumento de Ca^{2+} sensible a IP-3R en las células.

Efecto del inhibidor de PKC BiSM-1 sobre la fosforilación de Erk1/2 inducida por BK

En este experimento, las células AC y AD se preincubaron con el inhibidor específico de PKC, BiSM-1 antes de la BK. Tal como se muestra en la Figura 4B, la fosforilación de Erk1/2 inducida por BK se volvió a suprimir (tanto en células AC como en AD). La ANOVA de dos vías mostró efectos del tratamiento significativos. Este resultado indica que se requiere la actividad de PKC para la activación de Erk1/2 estimulada por BK, tanto en células AC como en AD.

Efecto del inhibidor de la proteína C-src tirosina quinasa, PP1, sobre la fosforilación de Erk1/2 inducida por BK

Para ensayar si la PTK no receptora, C-src está implicada en la activación de Erk1/2 por BK, se preincubaron células AC y AD con PP1 10 μ M antes de la BK. De forma similar al 2ABP y a BiSM-1, anteriormente descritos, el PP1 inhibió completamente la fosforilación de Erk1/2 inducida por BK (Figura 4C). La ANOVA de dos vías mostró efectos de tratamiento significativos ($F_{1,40} = 234$; $p < 0,0001$). Por lo tanto, este resultado sugiere que la actividad de la PTK C-src también está implicada en la activación de la Erk1/2 por la BK.

Efectos del inhibidor de la PI3 quinasa, LY294002, sobre la fosforilación de Erk1/2 inducida por BK

Se dirigió un estudio para probar si la actividad de la PI3 quinasa está implicada en la activación de la Erk1/2 estimulada por BK. Los fibroblastos se incubaron con LY294002 5 μ M anteriormente a la BK. Al contrario que los efectos de los inhibidores de IP-3R, PCK y C-src, LY294002 provocó una inhibición modesta, aunque significativa, de la fosforilación de Erk1/2 en células con AC (Figura 4D) mientras que no pudo inhibir la fosforilación de Erk1/2 inducida por BK en células AD (Figura 4D). Una ANOVA de dos vías mostró efectos del tratamiento significativos ($F_{1,20} = 136,2$, $p < 0,001$) y efectos de grupo ($F_{1,20} = 11,55$, $p < 0,05$). Este resultado sugiere que la actividad de la PI3 quinasa no está implicada en la fosforilación de Erk1/2 inducida por BK en células de pacientes AD.

Efectos de la BK sobre la activación de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB)

Se ensayó el efecto de la BK sobre la activación de CREB, que normalmente está más abajo de Erk1/2. Tal como se muestra en la Figura 5, BK 10 nM indujo una fosforilación muy significativa de CREB, tanto en células AC como en AD. La fosforilación aumentada se detectó tan pronto como 5 minutos después de la estimulación con BK, y aumentó más a los 10 minutos (Figura 5A). La ANOVA de dos vías mostró un efecto del tiempo significativo ($F_{1,28} = 14,09$, $p < 0,001$) pero ningún efecto de grupo. La Figura 5B muestra una fosforilación de CREB aumentada de forma similar, 10 minutos después del tratamiento con BK en células AC y AD. El tratamiento con BK también provocó una reducción marcada en la cantidad total de proteína CREB a los 10 minutos (Figura 5C) ($p < 0,001$). Resumiendo, no hubo diferencias significativas en la fosforilación de CREB inducida por BK o en la reducción en la CREB total entre células AC y AD.

Efectos de los inhibidores de PKC, C-src y PI3 quinasa sobre la fosforilación de CREB inducida por BK

El tratamiento de los fibroblastos con el inhibidor de PKC, BiSM-1, suprimió completamente la fosforilación de CREB estimulada por BK (Figura 6A). Una ANOVA de dos vías mostró un efecto del tratamiento significativo ($F_{1,30} = 53,76$, $p < 0,0001$), pero ningún efecto de grupo. De forma similar, el inhibidor de c-src PP1 inhibió la fosforilación de CREB estimulada por BK (Figura 6B). Estos resultados indican nuevamente que tanto la PKC como la c-src están implicadas en la vía de señalización mediante la cual la BK activa tanto Erk1/2 como CREB. De forma similar al efecto con Erk1/2, el inhibidor de la PI3 quinasa, LY294002 inhibió parcialmente la fosforilación de CREB en AC pero no tuvo ningún efecto sobre la fosforilación de CREB en las células AD (Figura 6C). Una ANOVA de dos vías mostró un efecto del tratamiento significativo ($F_{1,30} = 36,23$; $p < 0,0001$) y efecto de grupo ($F_{1,30} = 4,7$; $p < 0,05$).

Expresión del receptor de BK B2 en fibroblastos

Para ensayar si la fosforilación aumentada de Erk1/2 y CREB como respuesta a la BK era debida a un incremento en el número de receptores de BK expresados en células AD, se llevó a cabo un estudio para medir la expresión del receptor de BK en células AD y AC de control mediante transferencia Western utilizando un anticuerpo específico para el receptor de BK de tipo 2 (BKb2R). No se observaron diferencias significativas en la expresión del receptor.

Mediante tinción inmunofluorescente, se demostró BK2bR en el citosol, núcleo, y áreas paranucleares de los fibroblastos (Figura 7). Sin embargo, no se observaron diferencias aparentes en intensidad o bien en patrón de distribución de BKb2R en células AD frente a células AC.

Discusión de los Resultados Experimentales

Los fibroblastos han servido de modelo útil para el estudio de la AD y otras enfermedades hereditarias, supuestamente por el hecho de que estas células, localizadas por todo el cuerpo, pueden expresar anomalías genéticas asociadas con algunas enfermedades del cerebro. El presente estudio ha dado a conocer indicios de que la estimulación del receptor de la BK da como resultado una transducción de señal anormal por la vía de la MAPK en fibroblastos AD. La BK es uno de los alérgicos endógenos y sustancias proinflamatorias más eficaces, desempeñando papeles importantes después de una lesión, enfermedad y CNS, así como inflamación periférica. En el presente estudio, la estimulación de BK aumentó y prolongó la fosforilación de Erk1/2 en células AD, de un modo que fue dependiente

de la liberación de Ca^{2+} a partir del receptor de IP3. Esto es coherente con informes anteriores en los que la liberación elevada de Ca^{2+} sensible a IP3 se detectó en fibroblastos de piel AD, después de la estimulación con BK (Gibson y otros, 1996; Etcheberrigaray y otros, 1998). Sin embargo, esta fosforilación prolongada de Erk1/2 de AD no fue debida a la expresión aumentada del receptor de BKb2 o Erk1/2, dado que ni la expresión ni la concentración de estas dos proteínas fue diferente en células AD en comparación con los controles. No es posible descartar otros cambios específicos en las propiedades o sensibilizaciones del receptor de BK y/o el receptor de IP3 en AD, además de los cambios en otras moléculas implicadas en esta vía de transducción de señal.

La activación del BK2bR estimula la activación del sistema PLC, que a su vez, junto con el Ca^{2+} intracelular aumentado, induce la activación de PKC. Además, se sabe que algunos receptores acoplados a proteína G, ("GPCRs") estimulan la actividad de la PTK c-src, la cual, como intermediario clave en la señalización celular, también puede participar en la activación de Erk1/2. El presente estudio ensayó la implicación tanto de PKC como de la PTK c-src en la fosforilación de Erk1/2 estimulada por BK. El hecho de que esta fosforilación se suprimiera por un inhibidor de PKC, BiSM-1, y un inhibidor de c-src, PP1, indica que la actividad de Erk1/2 está regulada por convergencia de múltiples proteínas quinasas más arriba. Del mismo modo que el inhibidor del receptor de IP3, 2ABP, tanto el BiSM-1 como el PP1 suprimieron la fosforilación de Erk1/2 de forma similar en células AD y de control. Es improbable, por lo tanto, que el aumento de la fosforilación de Erk1/2, asociado con AD fuera debido a la actividad elevada de la PKC o de la PTK c-src.

Al analizar la vía o vías de señalización que sustentan el aumento específico de AD de la fosforilación de Erk1/2, los presentes inventores ensayaron la implicación de la PI-3 quinasa, otro enzima implicado en la activación de Erk1/2 por GPCRs. En base a estudios de varios sistemas, la activación de la PI-3 quinasa después de la estimulación de GPCR es dependiente de la activación de la PKC, más abajo de Ras e implica la PTK c-src. El inhibidor específico de la PI-3 quinasa LY294002 sólo provocó una inhibición modesta de la fosforilación de Erk1/2 inducida por BK en fibroblastos de control, pero no tuvo efecto en células AD. Esto sugiere que, mientras que la PI-3 quinasa contribuye parcialmente a la fosforilación de Erk1/2 activada por BK en fibroblastos normales, la fosforilación de Erk1/2 en células AD parece ser independiente de este enzima.

Una función muy importante de Erk1/2/MAPK es la activación de la expresión de genes mediante la regulación de factores transcripcionales. La activación de CREB también se ha observado en el presente estudio (fosforilación de Ser133). A diferencia de la fosforilación de Erk1/2 en células de control, que duró menos de 10 minutos después del tratamiento con BK, estuvo presente CREB altamente fosforilada 10 minutos después del tratamiento con BK, tanto en células AD como de control, indicando un curso de tiempo diferente para la activación de CREB. Los inhibidores de PKC, c-src y PI3 quinasa inhiben la fosforilación de CREB de un modo similar a su inhibición de la fosforilación de Erk1/2, indicando que la activación de CREB está regulada por la misma vía de señalización. Mientras que PP1 inhibió completamente la fosforilación de CREB estimulada por BK, dio como resultado una expresión aumentada de la proteína CREB en células de control (Figura 6B), reflejando supuestamente un mecanismo de retroalimentación compensatorio normal. Sin embargo, este efecto de PP1 no se observó en células AD, sugiriendo que la regulación de la expresión de CREB puede verse afectada en la AD.

Los presentes resultados dan a conocer indicios de que la patogénesis de la AD implica trastornos de cascadas moleculares asociadas con MAPK, tal como se resume en la Figura 6. Resultados recientes de otros sugieren que la MAPK es importante para las funciones del cerebro que están relacionadas con la plasticidad neuronal, por ejemplo, el aprendizaje y la memoria. Erk fosforila la proteína tau en múltiples sitios Ser/Thr, entre los que se incluyen Ser262 y Ser356 (Reynolds y otros, 2000), los cuales se encuentran en las regiones de unión a microtúbulos de tau. La fosforilación de la Ser262 compromete marcadamente la capacidad funcional de tau para organizar y estabilizar los microtúbulos. Con las vías de señalización intermedias que implican MAPK, las células pueden responder a señales extra e intracelulares mediante la inducción de una expresión aberrante de muchas otras proteínas.

Las manifestaciones sistémicas de anormalidades en la señalización molecular, tal como la fosforilación aumentada o prolongada de MAPK, puede reflejar aberraciones en el CNS, por ejemplo, pérdida de la memoria, que tienen consecuencias conductuales/cognitivas graves. De este modo, la detección de anormalidades específicas de la AD en MAPK y sus vías de señalización relacionadas en células encontradas en sitios periféricos de fácil acceso, ejemplificadas por los fibroblastos de piel, proporciona medios eficaces y fiables para el diagnóstico temprano de la AD, así como para la identificación de dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos.

Ejemplo 2

Utilizando fibroblastos de piel de individuos con la demencia de Huntington (HD), se llevaron a cabo ensayos para determinar si la actividad de Erk1/2 prolongada inducida por BK era específica de la AD. La Figura 8 representa el efecto de la bradiquinina sobre la fosforilación de Erk1/2 en fibroblastos. $N = 4$ y prueba t $P = 0,39$. Las células HD se trataron con BK 10 nM durante 10 minutos. La Figura 8 muestra que cuando se trataron células HD con BK 10 nM durante 10 minutos, los niveles de fosforilación de Erk1/2 no fueron diferentes a los de los controles de las mismas edades, indicando que el aumento de la actividad de Erk1/2 inducido por BK no está presente en la demencia de Huntington. Por lo tanto, un ensayo de MAP quinasa para la enfermedad de Alzheimer, según la presente invención, da un diagnóstico negativo para la demencia de Huntington, mostrando que el ensayo es específico para el Alzheimer.

En las realizaciones descriptivas preferentes de la presente invención, se utiliza terminología específica para mayor claridad. Sin embargo, no se pretende que la presente invención esté limitada a la terminología específica seleccionada de este modo. Se debe comprender que cada elemento específico incluye todos los equivalentes técnicos, los cuales funcionan de un modo similar para conseguir un mismo objetivo.

Referencias

La solicitud de patente provisional de U.S.A. 60/312.064, archivada el 27 de febrero de 2001, y las siguientes publicaciones se incluyen en la presente como referencia.

1. Barrow, P. A. Empson, R. M. Gladwell, S. J. Anderson, C. M. Killick, R., Yu, X., Jefferys, J. G. y Duff, K. (2000) *Neurobiol Dis* 7, 119-126 ("Barrow y otros, 2000").

2. Bassa BV, Roh DD, Vaziri ND, Kirschenbaum MA, Kamanna VS (1999) *Am J Physiol* 277, F328-337 ("Bassa y otros, 1999").

3. Berridge MJ (1984) *Biochem J* 220, 345-360 ("Berridge, 1984").

4. Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E. W., y Mandelkow, E. (1993) *Neuron* 11, 153-163 ("Biernat y otros, 1993").

5. Cruzblanca H, Koh DS, Hille B. (1998) "La bradiquinina inhibe la M corriente a través de la fosfolipasa C y la liberación de Ca^{2+} de depósitos de Ca^{2+} sensibles a IP_3 en neuronas simpáticas de rata" ("Bradykinin inhibits M current via phospholipase C and Ca^{2+} release from IP_3 -sensitive Ca^{2+} stores in rat sympathetic neurons"). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7151-7156 ("Cruzblanca y otros, 1998").

6. Ekinici, F. J. y Shea, T. B. (1999) *Cell Mol. Neurobiol.* 19, 249-260 ("Ekinici y Shea, 1999").

7. Etcheberrigaray E, Gibson GE, Alkon DL (1994) "Mecanismos moleculares de la memoria y la patofisiología de la enfermedad de Alzheimer" ("Molecular mechanisms of memory and the pathophysiology of Alzheimer's disease"). *Ann N Y Acad Sci* 747: 245-55 ("Etcheberrigaray y otros, 1994")

8. Etcheberrigaray, R., Hirashima, N., Nee, L., Prince, J., Govoni, S., Racchi, M., Tanzi, R. E. y Alkon, D. 1. (1998) *Neurobiol. Dis.* 5, 37-45 ("Etcheberrigaray, y otros, 1998").

9. Gibson, G. E., Zhang, H., Toral-Barza, L., Szolosi, S., y Tofel-Grehl, B. (1996) *Biochim, Biophys Acta* 1316, 71-77 ("Gibson y otros, 1996").

10. Grant SM, Morinville A, Maysinger D, Szyf M, Cuello AC. (1999) *Brain Res Mol Brain Res.* 72, 115-20 ("Grant y otros, 1999").

11. Greenberg SM, Koo EH, Selkoe DJ, Qiu WQ, Kosik KS. (1994) "La proteína precursora del beta-amiloide secretada estimula la proteína quinasa activada por mitógeno y aumenta la fosforilación de tau" ("Secreted beta-amyloid precursor protein stimulates mitogen-activated protein kinase and enhances tau phosphorylation"). *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 7104-7108 ("Greenberg y otros, 1994").

12. Hirashima, N., Etcheberrigaray, R., Bergamashi, S., Racchi, M., Battaini, F., Binetti, G., Govoni, S., Alkon, D. L. (1996) *Neurobiol Aging* 17, 549-555 ("Hirashima, y otros, 1996").

13. Ito E, Oka K, Etcheberrigaray R, Nelson TJ, McPhie DL, Tofel-Grehl B, Gibson GE, Alkon DL (1994) "La movilización interna de Ca^{2+} se encuentra alterada en fibroblastos de pacientes con enfermedad de Alzheimer" ("Internal Ca^{2+} mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease"). *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 534-538 ("Ito y otros, 1994").

14. Leissring, M. A., Akbari, Y., Fanger, C. M., Cahalan, M. D., Mattson, M. P. and Laferla, F. M. (2000) *J Cell Biol* 149, 793-798 ("Leissring y otros, 2000").

15. Leissring, M. A., Parker, I., LaFerla, F.M. (1999) *J Biol Chem* 274, 32535-32538 ("Leissring y otros, 1999").

16. Lu, Q., Soria, J. P., and Wood, J. G. (1993) *J. Neurosci. Res.* 35, 439-444 ("Lu y otros, 1993").

17. Mattson, M. P., Zhu, H., Yu, J. and Kindy, M. S. (2000) *J. Neurosci.* 20, 1358-1364 ("Mattson y otros, 2000").

18. McDonald DR, Bamberger ME, Combs CK, Landreth GE (1998) *J Neurosci* 18, 4451-4460 ("McDonald y otros, 1998").

19. **Pascale A, Bhagavan S, Nelson TJ, Neve RL, McPhie DL, Etcheberrigaray R.** (1999) “Capacidad de respuesta del calcio aumentada inducida por BK en células PC12 que expresan el fragmento C100 de la proteína precursora de amiloide” (“Enhanced BK-induced calcium responsiveness in PC 12 cells expressing the C100 fragment of the amyloid precursor protein”). *Brain Res Mol Brain Res* 72: 205-2 (“Pascale y otros, 1999”).

20. **Putney J. W. Jr.** (2000) *Neuron* 27, 411-412 (“Putney, 2000”).

21. **Reynolds, C. H., Betts, J. C., Blackstock, W. P., Nebreda, A. R. and Anderton, B. H.** (2000) *J. Neurochem.* 74, 1587-1595 (“Reynolds y otros, 2000”).

22. **Sheehan JP, Swerdlow RH, Miller SW, Davis RE, Parks JK, Parker WD, Tuttle JB.** (1997) *J Neurosci* 17,4612-4622 (“Sheehan y otros, 1997”).

23. **Yoo, A. S., Cheng, I., Chung, S., Grenfell, T. Z., Lee, H., Pack-Chung, E., Handler, M., Shen, J.,** “Modulación de la entrada de calcio capacitativa mediada por presenilina” (“Presenilin-mediated modulation of capacitative calcium entry”). *Neuron.* 2000 Sep; 27 (3): 561-72 (“Yoo y otros, 2000”).

REIVINDICACIONES

1. Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer que comprende:

poner en contacto células *in vitro* de un individuo con un agente que provoca la liberación de calcio intracelular a través del receptor del inositol 1,4,5-trifosfato (IP3),

medir la cantidad de fosforilación de una proteína MAPK en las células del individuo *in vitro* en uno o más tiempos después de la etapa de contacto, y

comparar la cantidad de fosforilación de la proteína MAPK en las células del individuo *in vitro* en uno o más tiempos con la cantidad de fosforilación en células de un individuo de control sin Alzheimer *in vitro* en los mismos tiempos después de poner en contacto las células de control con el agente,

en el que la fosforilación aumentada de la proteína MAPK en las células del individuo comparada con las células de control, es un diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer.

2. Método, según la reivindicación 1, en el que el agente es bradiquinina, un agonista del receptor de la bradiquinina o bombesina.

3. Método, según la reivindicación 1 ó 2, en el que la proteína MAPK es Erk1/2.

4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células son fibroblastos de piel.

5. Método para el cribado de compuestos para la identificación de un compuesto útil para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer, que comprende:

poner en contacto células de prueba de un individuo con AD con un compuesto que se está cribando,

estimular las células de prueba antes, durante o después de la etapa de contacto con un agente que provoca la liberación del calcio intracelular a través del receptor del inositol 1,4,5-trifosfato (IP3),

medir la cantidad de fosforilación de la proteína MAPK en las células de prueba en uno o más tiempos después de la estimulación de las células de prueba,

comparar la cantidad de fosforilación de la proteína MAPK en las células de prueba en uno o más tiempos con la cantidad de fosforilación en el mismo tiempo o tiempos en las células de control de un individuo con AD que no se han puesto en contacto con el compuesto, y

aceptar un compuesto que inhibe o evita la fosforilación aumentada como compuesto principal, y rechazar un compuesto que no inhibe o evita la fosforilación aumentada.

6. Método, según la reivindicación 5, en el que el agente es bradiquinina o un agonista del receptor de bradiquinina.

7. Método, según la reivindicación 5 ó 6, en el que la proteína MAPK es Erk1/2.

8. Equipo de prueba de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer que comprende un anticuerpo anti-fosfo-proteína MAPK y bradiquinina.

9. Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer que comprende:

a) poner en contacto células de fibroblastos de piel *in vitro* de un individuo con una concentración de bradiquinina eficaz, estimuladora de la fosforilación;

b) poner en contacto células de fibroblastos de piel *in vitro* de un individuo de control sin Alzheimer con una concentración de bradiquinina eficaz, estimuladora de la fosforilación;

c) Medir la cantidad de Erk1/2 fosforilada en las células del individuo *in vitro* en uno o más tiempos seleccionados del grupo que consiste en 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, y 30 minutos; mediante transferencia Western, utilizando un anticuerpo específico de fosfo Erk1/2;

d) Medir la cantidad de Erk1/2 fosforilada en las células *in vitro* de un individuo de control sin Alzheimer en el mismo tiempo o tiempos que en (c);

e) Normalizar la cantidad de Erk1/2 fosforilada en las etapas (c) y (d) a la cantidad de proteína presente en dichas células;

ES 2 305 234 T3

comparando la cantidad de Erk1/2 fosforilada en las células del individuo con la cantidad de Erk1/2 fosforilada en las células de control sin Alzheimer, en el que una cantidad aumentada de Erk1/2 fosforilada en las células del individuo comparada con la de las células de control sin Alzheimer es un diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer.

5 10. Método de cribado para la identificación de un compuesto útil para el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer que comprende:

10 a) poner en contacto fibroblastos de piel de prueba de un individuo con enfermedad de Alzheimer con un compuesto que se va a cribar;

b) poner en contacto fibroblastos de piel de control de dicho individuo con un agente de control para dicho compuesto o incubar dichos fibroblastos de piel de control en ausencia de dicho compuesto o bien de dicho agente de control;

15 c) estimular los fibroblastos de prueba y de control antes, durante o después del contacto en las etapas (a) y (b) con una concentración de bradiquinina eficaz, estimuladora de fosforilación;

20 d) medir la cantidad de Erk1/2 fosforilada en los fibroblastos de prueba y de control en uno o más tiempos seleccionados del grupo que consiste en 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, y 30 minutos, mediante transferencia Western, utilizando un anticuerpo específico de fosfo Erk1/2, en el que la cantidad de Erk1/2 fosforilada se normaliza a la cantidad de proteína presente en dichos fibroblastos de prueba y de control;

25 e) comparar la cantidad de Erk1/2 fosforilada en los fibroblastos de prueba con la cantidad de Erk1/2 fosforilada en los fibroblastos de control para determinar si el compuesto inhibe o evita el aumento en fosforilación de Erk1/2 inducido por bradiquinina en las células de prueba comparado con las células de control, en el que un compuesto que inhibe o evita la fosforilación aumentada se identifica como útil para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer.

30 11. Utilización de un inhibidor de la fosforilación de MAPK, para la preparación de una composición farmacéutica para la reducción de la proteólisis de la proteína precursora de amiloide, la secreción de la proteína β amiloide, y/o la fosforilación de la proteína tau para tratar, de este modo, la enfermedad de Alzheimer, y el inhibidor de la fosforilación se selecciona del grupo que comprende: un inhibidor de la actividad de la proteína quinasa C, un inhibidor de la actividad de la proteína C-scr tirosina quinasa y un inhibidor del receptor de IP-3, en la que el inhibidor de la actividad de la proteína quinasa C es BiSM-1, el inhibidor de la actividad de la proteína C-scr tirosina quinasa es PP1 y el
35 inhibidor del receptor de IP-3 es borato de 2-aminoetoxidifenilo.

40

45

50

55

60

65

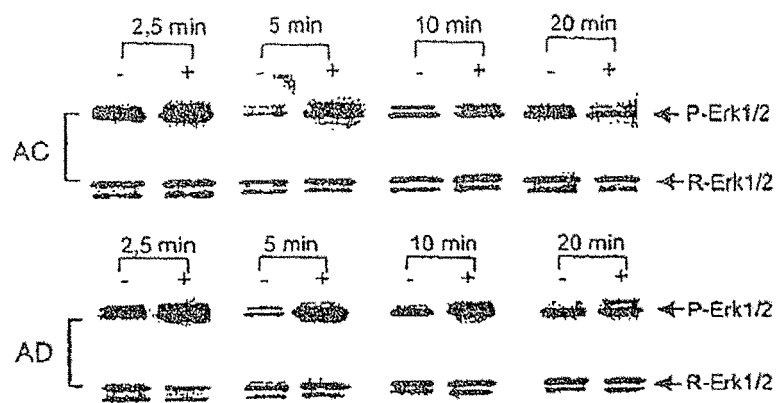


FIGURA 1A1

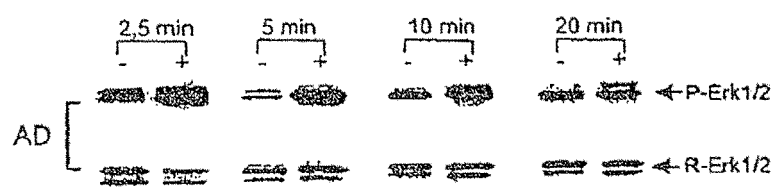


FIGURA 1A2

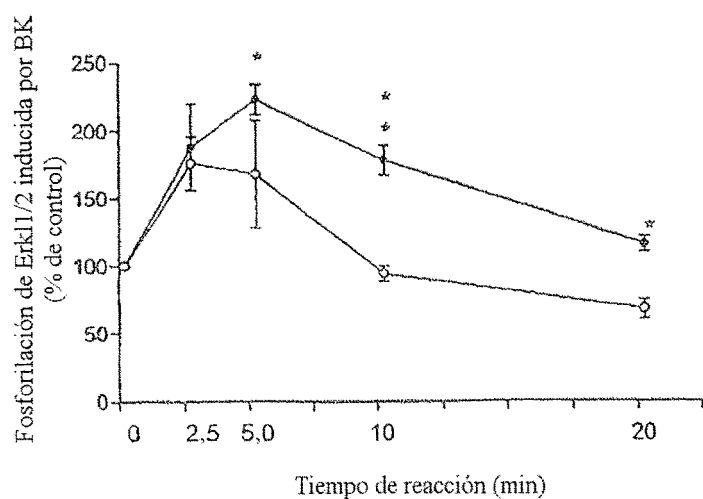


FIGURA 1B

FIGURA 1

FIGURA 2 B

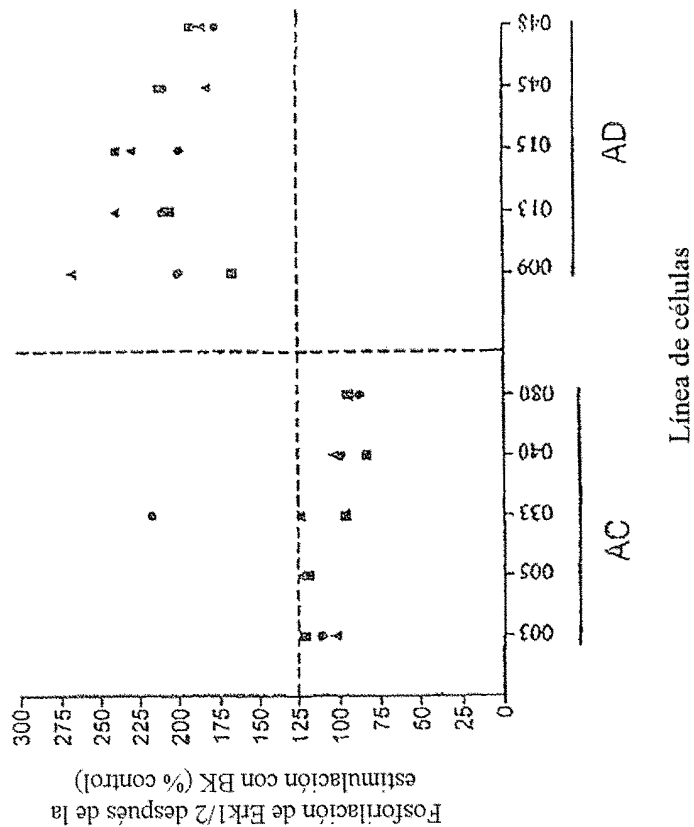


FIGURA 2 A

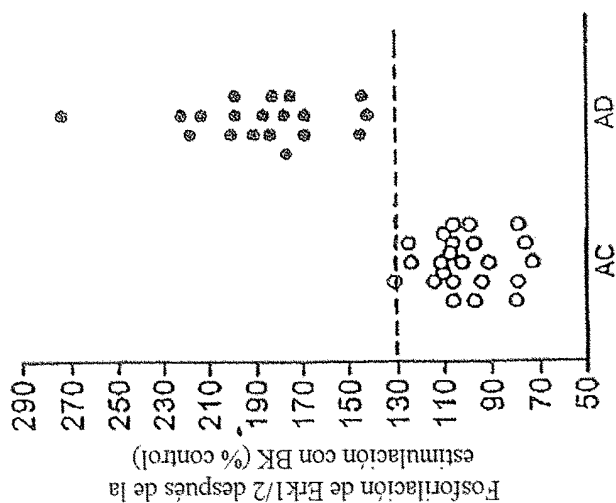


FIGURA 2

FIGURA 3A1

FIGURA 3A2

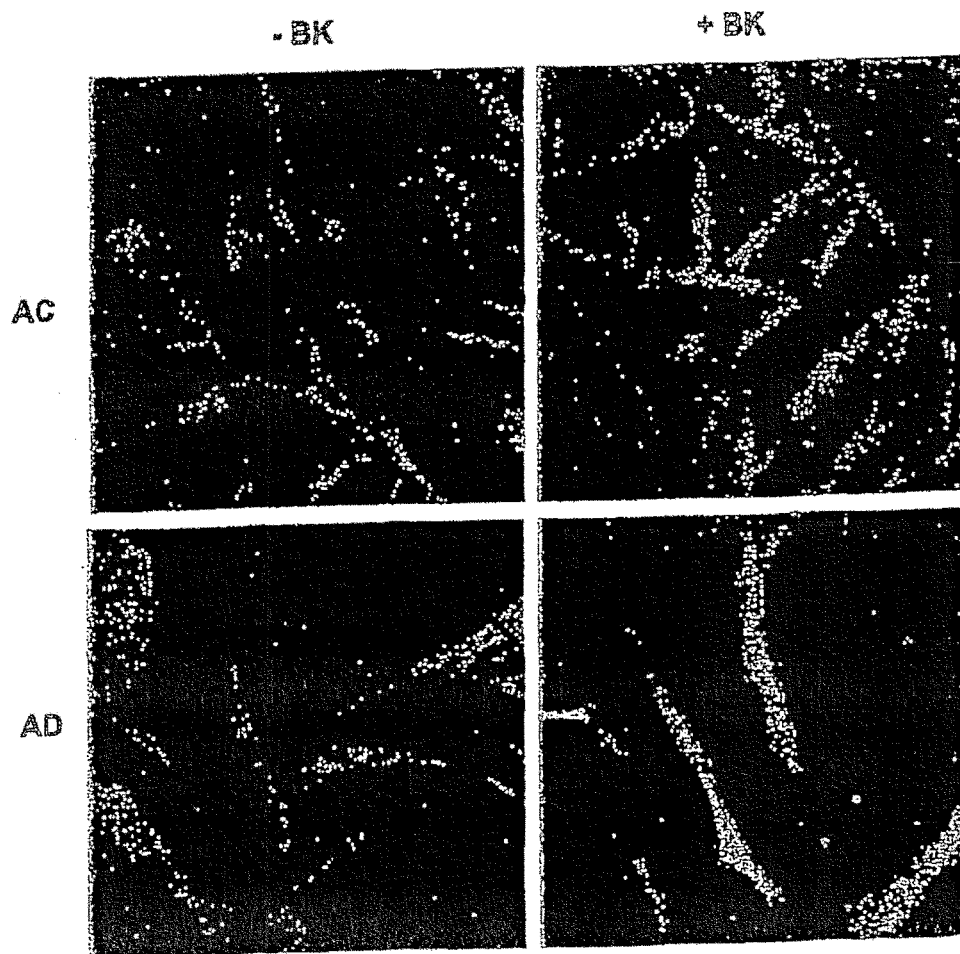


FIGURA 3B1

FIGURA 3B2

FIGURA 3

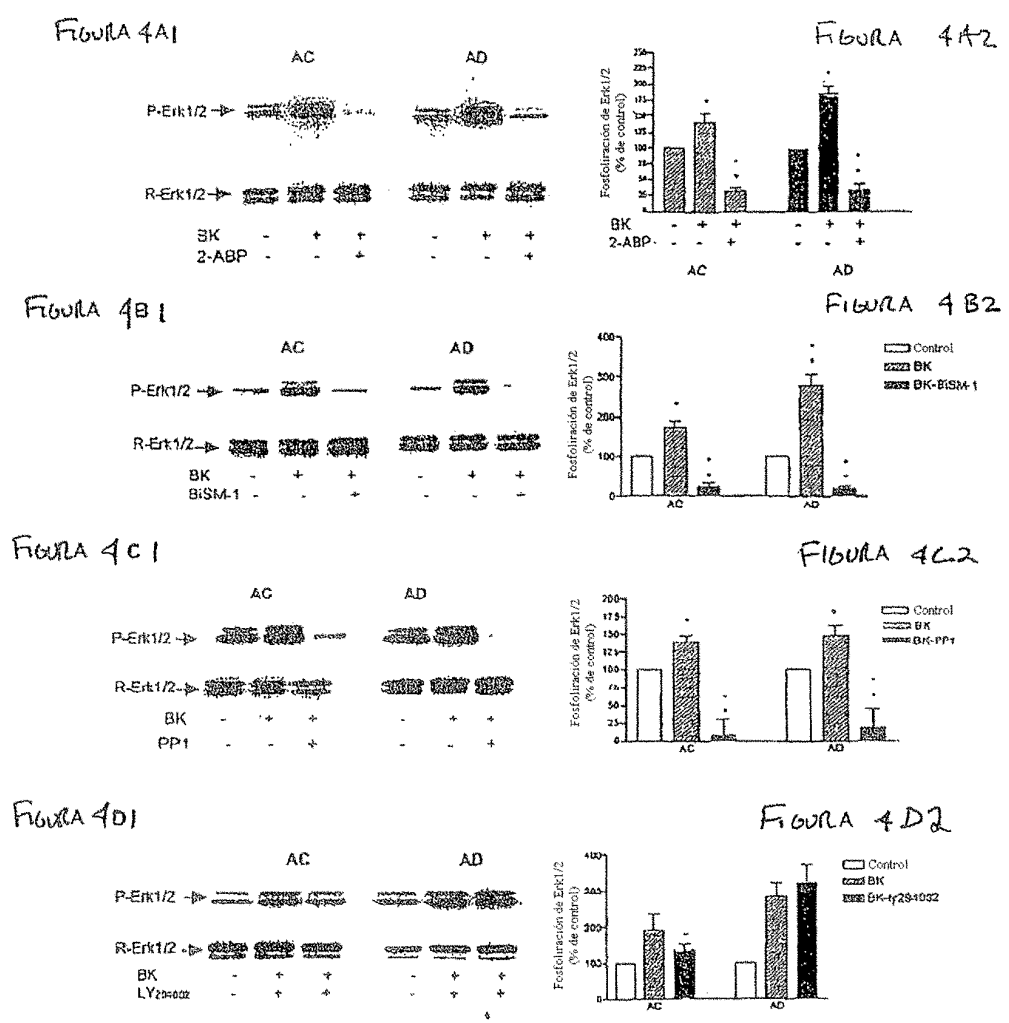


FIGURA 4

FIGURA 5 A

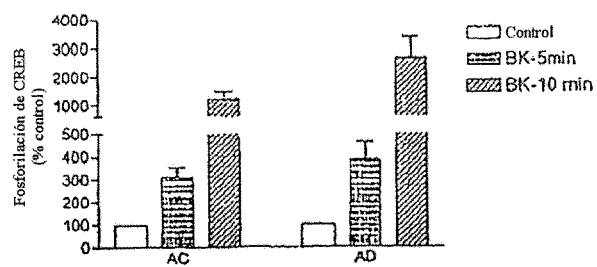


FIGURA 5 B 1



FIGURA 5 B 2

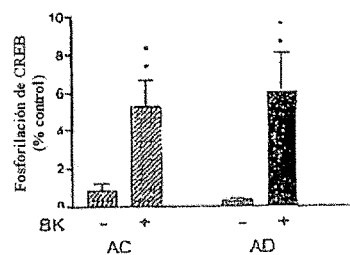


FIGURA 5 C 1

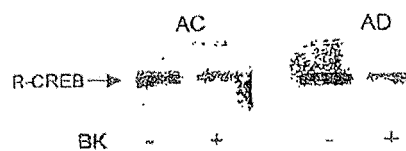


FIGURA 5 C 2

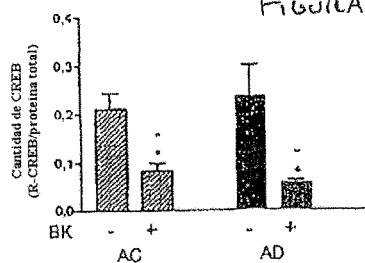


FIGURA 5

FIGURA 6A1

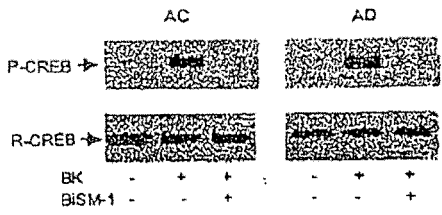


FIGURA 6A2

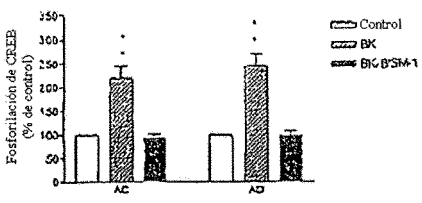


FIGURA 6B1

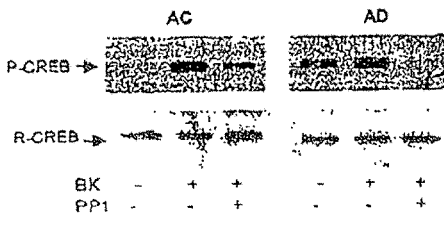


FIGURA 6B2

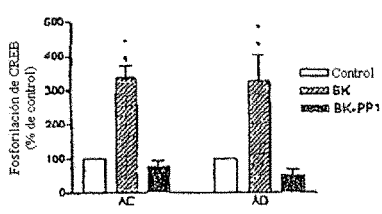


FIGURA 6C1

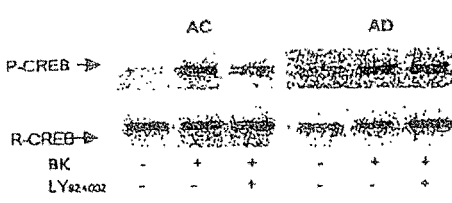


FIGURA 6C2

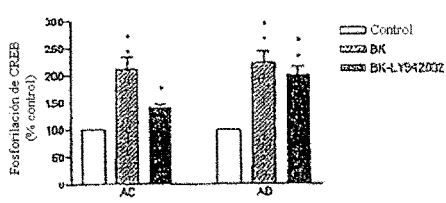


FIGURA 6

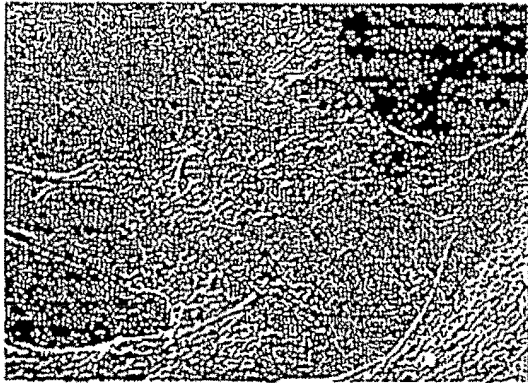


FIGURA 7A

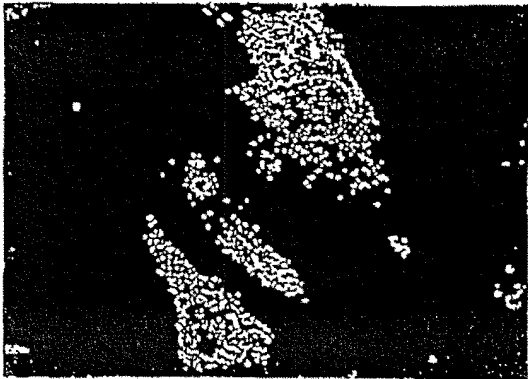


FIGURA 7 B

FIGURA 7

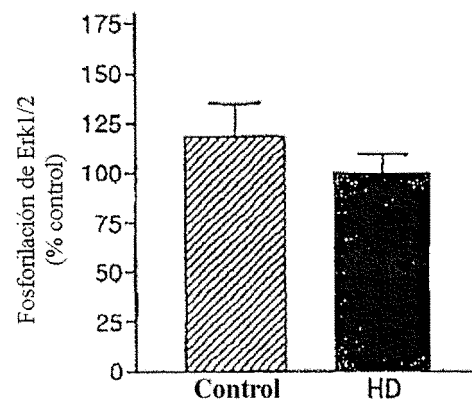


FIGURA 8